

WO9849274

Publication Title:

THERMOSTABLE DNA POLYMERASE AND INTEINS OF THE THERMOCOCCUS FUMICOLANS SPECIES

Abstract:

Abstract of WO9849274

The invention concerns a purified thermostable DNA polymerase, thermostable archae bacteria DNA polymerase of the Thermococcus fumicola species having a molecular weight of the order of 89000 daltons and its thermostable inteins. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.

ATTORNEY DOCKET NUMBER:10589-013-999
SERIAL NUMBER: 10/551,301
REFERENCE: B02

BEST AVAILABLE COPY



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 9/12 // 15/54		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/49274 (43) Date de publication internationale: 5 novembre 1998 (05.11.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00761</p> <p>(22) Date de dépôt international: 29 avril 1997 (29.04.97)</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): APPLI-GENE-ONCOR [FR/FR]; Parc d'Innovation, Rue Geiler de Kaysersberg, Boîte postale 72, F-67402 Illkirch (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): QUERELLOU, Joël [FR/FR]; L'Arc'Hantel, F-29280 Brest (FR). CAMBON, Marie-Anne [FR/FR]; 8, allée de Stelle, F-29280 Plouzane (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: THERMOSTABLE DNA POLYMERASE AND INTEINS OF THE THERMOCOCCUS FUMICOLANS SPECIES</p> <p>(54) Titre: ADN POLYMERASE THERMOSTABLE ET INTEINES DE L'ESPECE THERMOCOCCUS FUMICOLANS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a purified thermostable DNA polymerase, thermostable archaea bacteria DNA polymerase of the <i>Thermococcus fumicola</i> species having a molecular weight of the order of 89000 daltons and its thermostable inteins.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne une ADN polymérase purifiée thermostable ADN polymérase thermostable d'archaeobactéries de l'espèce <i>Thermococcus fumicola</i> ayant un poids moléculaire de l'ordre de 89 000 daltons, ainsi que ses intéines thermostables.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CP	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

ADN POLYMERASE THERMOSTABLE ET INTEINES DE L'ESPECE
THERMOCOCCUS FUMICOLANS

La présente invention concerne une nouvelle ADN polymérase thermostable ainsi que ses deux intéines, provenant d'une archaebactéries de l'espèce *Thermococcus fumicola*.

Les ADN polymérases sont des enzymes impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN dans toute cellule vivante. On connaît aujourd'hui de nombreuses ADN polymérases isolées de micro-organismes tel que *E. coli* (ADN polymérase I) ou du phage T4. Des ADN polymérases ont aussi été identifiées et purifiées et à partir de micro-organismes thermophiles comme *Thermus aquaticus* (Taq polymérase, Chien, A. et al. J. Bact. 1976, 127:1550-1557 ; Kaladin et al. Biokhimiya 1980, 45:644-651), *Thermus thermophilus*, ou encore des espèces du genre *Bacillus* (demande de brevet Européen publiée sous le No. 699 760), *Thermococcus* (demande de brevet Européen No. 455 430), *Sulfolobus* et *Pyrococcus* (demande de brevet Européen publiée sous le No. 547 359). Parmi ces ADN polymérases issues d'archaebactéries on peut citer la *Pfu*, isolées de *Pyrococcus furiosus* (18), la *Vent*™ polymerase de *Thermococcus litoralis* (10), la 9°N de *Pyrococcus sp.* 9°N (15) et la DeepVent™ de *Pyrococcus GB-D*, les deux premières provenant de souches du littoral (Baie de Naples), les deux suivantes de souches sous-marines profondes.

Le mécanisme d'action des ADN polymérases est aujourd'hui relativement bien connu et consiste en une réplication de l'ADN à l'identique selon un mode semi-conservatif. Le brin recopié sert de matrice et les quatre nucléotides triphosphates sont le substrat de cette polymérisation. Les enzymes ayant une activité ADN polymérase sont aujourd'hui de plus en plus utilisées *in vitro* afin de travailler en biologie moléculaire dans divers buts tels le clonage, la détection d'erreurs, le

séquençage, le marquage, et de façon générale, l'amplification de séquences d'acides nucléiques.

Cette amplification, *in vitro*, de séquences d'acide désoxyribonucléique fait appel à la technique de 5 la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) décrite dans les brevets Européens No. 200 362 et 201 184. Le principe de cette technique est basé sur la réalisation de cycles successifs d'extension d'amorces mettant en oeuvre les quatre nucléotides triphosphates ainsi qu'une 10 ADN polymérase et un ADN matrice à recopier. A chaque cycle, l'enzyme double le nombre de brins d'ADN disponibles et entre chaque cycle une thermodénaturation est nécessaire afin d'ouvrir la double hélice d'ADN pour le cycle suivant. Les températures utilisées pour cette 15 étape de thermodénaturation ne sont pas compatibles avec la conservation de l'activité de la plupart des ADN polymérases connues, telle la Klenow. C'est ainsi que des nombreux efforts de recherche ont été réalisés afin de trouver des enzymes supportant ces températures.

20 Cependant, si les micro-organismes thermophiles sont aujourd'hui connus, il reste encore difficile d'obtenir ces enzymes thermostables avec des rendements de production suffisants. La biologie moléculaire et le génie génétique permettent de palier cet inconvénient. 25 Ainsi, une fois repéré dans le génome, le gène codant pour l'ADN polymérase est cloné, séquencé puis recloné dans un vecteur d'expression afin de produire la protéine dite alors recombinante, chez un hôte mésophile plus aisé à cultiver tel *E. coli* ou *S. cerevisiae*. Cette méthode 30 d'expression chez *E. coli* a notamment été décrite dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le No. WO 89/06691 pour produire l'ADN polymerase de *Thermus aquaticus*.

35 L'ADN polymérase de l'invention provient d'une archaebactéries de l'espèce *Thermococcus fumicolans*. Outre ses propriétés thermostables la rendant particulièrement efficace notamment dans une processus de PCR, cette ADN

polymérase est remarquable en ce qu'elle présente deux "introns protéiques", encore appelés "intéines", au niveau de son polypeptide précurseur.

La séquence nucléotidique de ses intéines est 5 insérée dans celle de l'ADN polymérase, généralement au niveau de sites conservés impliqués, après traduction, dans les réactions catalytiques. Ces séquences sont transcrives et traduites en même temps que celle de l'ADN polymérase et l'épissage autocatalytique des intéines 10 produit alors trois enzymes: deux intéines et une ADN polymérase.

On trouve de telles intéines également au sein 15 d'autres molécules telles l'ATPase vacuolaire chez *S. cerevisiae* (4), GyrA chez *Mycobacterium leprae* (7), Rec A chez *Mycobacterium tuberculosis* (5, 6). Les intéines font partie pour leur majorité de la famille des endonucléases de type "homing endonucleases" puisqu'elles coupent l'ADN en un site reconnu, à l'endroit même où leur séquence nucléotidique vient s'insérer.

20 Le développement des biotechnologies tant dans la recherche que dans les domaines de la médecine ou de l'agro-alimentaire, nécessite de disposer de divers types d'ADN polymérases susceptibles d'améliorer quantitativement et qualitativement des techniques aussi 25 diverses que le clonage, la détection, l'amplification de séquences d'ADN. La présente invention vise précisément à offrir une nouvelle ADN polymérase thermostable qui est issue d'une espèce récemment décrite: *Thermococcus fumicola* (8). Cet isolat a été isolé à partir de 30 fragments de cheminées prélevées dans le bassin Nord-Fidgien lors de la campagne franco-japonnaise STARMER en 1989. Cette espèce, anaérobie stricte, présente une température optimale de croissance de 90°C, ce qui est relativement élevé pour un *Thermococcus*. Son pH optimum 35 est de 8,8, et son taux de salinité de 20 g/l à 40 g/l.

L'invention a donc pour objet une ADN polymérase purifiée thermostable d'archaeobacteries de

l'espèce *Thermococcus fumicolans* ayant un poids moléculaire de l'ordre de 89000 Da ainsi que ses intéines thermostables, dont le gène comportant les deux séquences codant pour lesdites intéines a été cloné.

5 Les travaux de recherche ayant permis d'identifier, de séquencer et d'étudier l'ADN polymérase de l'invention ont été réalisée à partir de la souche *Thermococcus fumicolans* ST557 déposée à la Collection de l'Institut Pasteur (CIP) sous le numéro CIP 104680. Cette 10 ADN polymerase sera dénommée dans ce qui suit *Tfu*. Sa séquence de 774 acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2. Un poids moléculaire de 89797 Da et un pI de 8.1 ont été déduits de cette séquence.

15

L'invention concerne donc l'ADN polymérase purifiée thermostable d'archaeobactéries de l'espèce *Thermococcus fumicolans* ayant un poids moléculaire de l'ordre de 89 000 daltons ainsi que ses dérivés 20 enzymatiquement équivalents. On entend par dérivés enzymatiquement équivalent, les polypeptides et protéines constitués par ou comprenant la séquence en acides aminés représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2 dès lors qu'ils présentent les 25 propriétés de l'ADN polymérase de *Thermococcus fumicolans*. A ce titre l'invention envisage plus particulièrement une ADN polymérase dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou un fragment de celle-ci ou encore un assemblage de tels fragments, comme 30 la séquence de 774 acides aminés représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2.

En effet, la présence de deux intéines I-*Tfu*-1 et I-*Tfu*-2 dans la séquence numéro SEQ ID NO:1, sont 35 susceptibles de conduire lors de la préparation par synthèse chimique ou par génie génétique, à des séquences d'ADN polymérase de *T. fumiculans* tronquées dont les

propriétés enzymatiques sont équivalente à celle de l'ADN polymérase de *T. fumicola* purifiée.

On entend aussi par dérivés, les séquences en acides aminés ci-dessus modifiées par insertion et/ou 5 délétion et/ou substitution d'un ou plusieurs aminoacides, pour autant que les propriétés de l'ADN polymérase de *T. fumicola* qui en résultent ne soient pas significativement modifiées.

10 L'invention concerne également une séquence d'ADN constituée par ou comprenant la séquence codant pour une ADN polymérase de l'invention.

15 La séquence d'ADN représenté dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SED ID NO: 1 représente une telle séquence. L'ADN codant pour l'ADN polymérase de *T. fumicola* et ses deux intéines est constituée par le nucléotides 357 à 5028. Les nucléotides 20 1 à 356 correspondent à la région promotrice de ce gène. En conséquence, l'invention a pour objet une séquence d'ADN constituée par ou comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 357 à 5028 de la SED ID NO: 1, ou un fragment de celle-ci ou encore un assemblage de tels fragments.

25 L'invention se rapporte tout particulièrement à une séquence d'ADN constituée par ou comprenant les nucléotides 357 à 1674 et 2755 à 3156 et 4324 à 5028 de la séquence d'ADN représenté dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SED ID NO: 1.

30 Cette séquence code pour l'ADN polymérase de *T. fumicola* dont la séquence de 774 acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SED ID NO: 2.

35 L'invention concerne autant l'ADN polymérase isolées et purifiées de la souche *Thermococcus fumicola* que l'ADN polymérase préparées par synthèse chimique, par exemple par ligature de fragments polypeptidiques, ou encore par les méthodes du génie génétique.

Dans le cadre de ces méthodes du génie génétique, l'invention a aussi pour objet un vecteur comprenant une séquence d'ADN définie précédemment, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire des ADN thermostables de l'invention.

5 Un procédé de production d'une ADN polymérase conforme à l'invention consiste:

10 - à transférer une séquence d'acide nucléique codant pour l'ADN polymérase ou un vecteur contenant ladite séquence dans un hôte cellulaire,

15 - à cultiver l'hôte cellulaire obtenu à l'étape précédente dans des conditions permettant la production de l'ADN polymérase,

20 - à isoler, par tous moyens appropriés, ladite ADN polymérase.

L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de 25 plantes ou d'insectes.

20 Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré.

25 L'ADN polymérase thermostable de l'invention est utile notamment dans les procédés d'amplification enzymatique de séquences d'acides nucléiques. En conséquence, l'invention a pour objet, de tels procédés mettant en oeuvre l'ADN polymérase thermostable décrite précédemment, ainsi que les kits d'amplification 30 comprenant, outre les réactifs généralement utilisés, une quantité adéquate de cette ADN polymérase.

35 L'invention a également pour objet une intéine purifiée thermostable d'archaebactéries de l'espèce *Thermococcus fumicolans*.

35 Comme indiqué précédemment, les intéines sont aussi définies comme des introns protéiques qui sont non pas épissés au niveau de l'ARN messager mais au niveau

d'une maturation protéique. Elles relèvent donc d'un seul gène traduit et transcrit en une seule étape, et constituent des sous produits de la maturation de la protéine codée par ce gène (Xu, M.G., Comb, D.G., Paulus H., Noren C.J., Shao Y., Perler, F., 1994, *Protein splicing : an analysis of the branched intermediate and its resolution by succinimidine formation. EMBO J.* 13, 5517-5522.)

Les intéines sont des endonucléases de restriction qui ont la propriété de couper l'ADN à l'endroit même où s'insère leur gène, et en conséquence, elles peuvent être considérées comme des séquences égoïstes.

Les intéines possèdent dans leur séquence toute l'information nécessaire à leur propre épissage puisqu'elles s'épissent dans *E. coli*.

Il est possible de distinguer quatre grandes étapes de maturation protéique :

- Une première étape de formation d'un intermédiaire linéaire qui possède une fonction ester. Cette réaction est dépendante du pH et de l'environnement local de cette liaison (nature des acides aminés). Ce principe est utilisé dans les kits de clonage, d'expression ou de purification mettant en oeuvre des intéines, car un changement de l'environnement provoque ou non un épissage. En effet, celui-ci serait inhibé à pH 11 et activé à pH 7,5.

- Une deuxième étape de transestérification qui permet de transformer l'intermédiaire précédent et de déplacer l'équilibre de la première étape.

- La troisième étape consiste en une cyclisation de l'asparagine libérant l'intéine.

- La quatrième étape est la stabilisation de la protéine mature et la formation d'une réelle liaison peptidique.

Il est donc possible de construire des mutants thermosensibles permettant de bloquer l'épissage

protéique aux températures d'expression (30°C) et de l'induire par chauffage.

Cette possibilité de contrôle de l'épissage protéique par la température peut-être utilisée dans des vecteurs de clonage avec une séquence codant pour l'intéine et des sites de clonage autour. Si la protéine à cloner et à exprimer est toxique pour l'hôte, on peut la cloner en deux fragments autour de la séquence d'intéine. Ainsi, globalement, le gène à cloner est complet mais il est interrompu par la séquence de l'intéine. Lors de l'expression, l'intéine se retrouve dans la protéine exprimée, la rendant ainsi inactive. Il est alors possible par chauffage, à la fin de l'induction, de libérer l'intéine par épissage autocatalytique et ainsi retrouver la protéine clonée active.

Les intéines permettent ainsi de réaliser des purifications et sont utilisés dans des kits selon le principe décrit ci-après. Certains résidus autour de site d'épissage de l'intéine sont modifiés. L'expression de la protéine recombinante est réalisée à basse température pour bloquer un éventuel épissage trop précoce. En C-terminal de l'intéine est fixé un site ayant une forte affinité pour la chitine. Lors de l'induction, la protéine clonée est exprimée ainsi que l'intéine et le site de fixation à la chitine. La purification est alors réalisée avec la chitine, sur des colonnes d'affinité, qui retiennent la chitine et aussi l'intéine et la protéine clonée, le tout faisant partie de la même pré-protéine. On hydrolyse alors l'extrémité N-terminale de l'intéine avec du DTT ou du β -mercaptoéthanol pour libérer la protéine clonée.

Les intéines sont aussi des endonucléases de restrictions thermostables, qui ont pour site de reconnaissance l'endroit même où s'insère leur gène dans la séquence "hôte". Elles possèdent une séquence nucléique répétée deux fois (LAGLIDADG) dans la protéine,

séquence plus ou moins conservée et qui correspond au site actif de reconnaissance et de coupure de l'ADN. Ces enzymes semblent aussi avoir besoin de Mg++ pour leur activité.

5 Il convient de remarquer que les deux intéines de l'invention sont coexprimées dans *E. coli* et sont autoépissées. Ce qui signifie qu'elle n'ont pas de toxicité pour l'hôte, à la différence de l'une des intéines de *Thermococcus litoralis* (9), et en conséquence 10 leur utilisation dans des kits d'expression ou de purification est aisée.

15 Une première séquence d'intéine selon l'invention est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:3. Cette intéine, dénommée I-Tfu-1, présente un poids moléculaire de 41 409 Da et un pI de 9,13, déduits de la séquence de 360 acides aminés de la séquence SEQ ID NO:3.

20 Une seconde séquence d'intéine selon l'invention est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:4. Cette intéine, dénommée I-Tfu-2, présente un poids moléculaire de 44 765 Da et pI de 9,6, déduits de la séquence de 389 acides aminés de la séquence SEQ ID NO:4.

25 Comme rappelé précédemment, les intéines thermostables de l'invention sont utiles notamment dans les procédés de restriction d'acides nucléiques et dans la mise au point de vecteurs d'expression permettant de réduire la toxicité de la protéine à exprimer en insérant 30 l'une des deux séquences d'intéines dans la séquence de la protéine à exprimer. Ceci peut se faire sans manipulation de la séquence des intéines si le clonage s'effectue chez *E. coli*, les techniques d'expression utilisées ayant démontré leur inocuité pour cet organisme hôte. En conséquence, l'invention a pour objet, de tels 35 procédés mettant en oeuvre l'une des deux ou les deux intéines thermostables décrites précédemment, ainsi que les kits d'expression ou de purification contenant l'une

ou les deux séquences codant pour les dites intéines thermostables.

5 L'invention concerne également une séquence d'ADN constituée par ou comprenant la séquence codant pour une intéine de l'invention.

10 Une séquence d'ADN codant pour l'intéine I-Tfu-1 est comprise entre les nucléotides 1675 et 2754 dans la séquence SED ID NO: 1 en annexe. Cette séquence d'ADN code pour l'intéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SED ID NO: 3.

15 Une séquence d'ADN codant pour l'intéine I-Tfu-2 est comprise entre les nucléotides 3157 et 4323 dans la séquence SED ID NO: 1 en annexe. Cette séquence d'ADN code pour l'intéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SED ID NO: 4.

20 L'invention concerne autant ces intéines thermostables isolées et purifiées de la souche *Thermococcus fumicola*ns que des intéines préparées par synthèse chimique, par exemple par ligature de fragments polypeptidiques, ou encore par les méthodes du génie génétique.

25 Dans le cadre de ces méthodes du génie génétique, l'invention a aussi pour objet un vecteur comprenant une séquence d'ADN définie précédemment, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire des ADN codant pour les intéines de l'invention. De tels procédés sont identiques à ceux rapportés précédemment pour l'ADN polymérase de *T. fumicola*ns.

35 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, donnés à titre non limitatifs et concernant le clonage, l'expression, la caractérisation et l'activité

de l'ADN thermostable de l'invention, et se référant aux dessins annexés dans lesquels :

5 - La figure 1 représente l'hybridation ADN-ADN de l'ADN génomique de *T. fumicola*ns digéré par diverses enzymes de restriction et hybridé avec les sondes GE23ClaI-HindIII et GE23XhoI-SalI.

10 - La figure 2 représente la stratégie de clonage, la structure du gène de l'ADN polymérase de *T. fumicula*ns et les produits du gène.

15 - La figure 3 représente les résultats de purification de la polymérase recombinante de *T. fumicola*ns après une colonne d'héparine sépharose, visualisés par SDS-PAGE.

20 - La figure 4 représente les résultats de purification de la polymérase recombinante de *T. fumicula*ns après une colonne Bleue HTrap n°2, visualisé par SDS-PAGE.

25 - La figure 5 représente les résultats de purification de la polymérase recombinante de *T. fumicola*ns après une colonne de phosphocellulose, visualisés par SDS-PAGE.

30 - La figure 6 représente les résultats de purification de la polymérase recombinante de *T. fumicola*ns après une colonne MonoQ, visualisés par SDS-PAGE.

- La figure 7 représente les résultats de PCR avec l'ADN polymérase de *T. fumicola*ns avec les fractions d'exclusion de la colonne MonoQ.

30 I- Matériel et méthodes.

1) Conditions de culture, plasmides et souches utilisées.

35 Les souches *Thermococcus litoralis* (DSM 5474^T) et *Pyrococcus furiosus* (DSM 3638^T) ont été obtenues auprès de la collection du Deutsche Sammlung von Microorganismen (DSM) Braunschweig-Stocheim, Allemagne.

La souche *Pyrococcus* sp. GE 23 a été isolée de cheminées de sources hydrothermales profondes et a été fournie par G Erauso (CNRS, Station Biologique de Roscoff, France). La souche *Thermococcus fumicola*ns a été obtenue auprès du 5 laboratoire de Microbiologie Marine de G. Barbier (IFREMER-DRV-VP-CMM) à Brest, France. Cette souche, *Thermococcus fumicola*ns a été obtenue par purification à partir de fragments de cheminées hydrothermales 10 recueillies dans le bassin nord-Fidgien lors de la campagne franco-japonaise STARMER effectuée en 1989 à 2000 mètres de profondeur.

Pyrococcus sp. GE23 a été cultivée à 85°C dans un milieu 2216S (DIFCO) à un pH de 6,5.

15 *Thermococcus fumicola*ns, décrite en 1996 (Godfroy et al.) est cultivée en conditions anaérobies dans un milieu contenant les éléments suivants: peptone 2g/l; extraits de levure 0,5g/l; sel de mer (Sigma) 30g/l; tampon PIPES 6,05g/l, soufre élémentaire 10g/l, rézasurine 1mg/l. Le pH est ajusté à 8,5 par de la soude 20 5N à 20°C.

La souche de *Escherichia coli* SURE (Stratagene, 25 La Jolla, Calif.) a été cultivée dans du milieu LB avec le ou les antibiotiques appropriés, à 37°C sous agitation. Cette souche a été utilisée comme hôte pour recevoir les constructions primaires à partir des vecteurs pUC 18 ou pBluescript. Les souches NovaBlue, BL21(DE3) et BL21(DE3)pLySS (Novagen, Madison, Wi.) ont été cultivées dans du milieu 2xYT avec les antibiotiques appropriés à 37°C ou 30°C. Ces souches ont été utilisées 30 comme hôtes pour les plasmides d'expression.

2) Isolement de l'ADN, hybridation et ADN recombinants.

35 L'ADN de haut poids moléculaire de *Thermococcus fumicola*ns a été isolé par la méthode de Charbonnier modifiée (3). Les cellules ont été resuspendues dans un tampon TE-Na 1X, puis lysées à 40°C pendant trois heures

avec un mélange de N-Lauryl-sarcosine 1%, dodecyl sulfate de sodium 1% et 0,4 mg/ml de protéinase K. Après la lyse, une centrifugation à 5000g pendant 10 minutes permet d'éliminer les débris cellulaires. L'ADN est extrait par un traitement au Phenol-Chloroforme-alcool Isoamylique ou PCI (25-24-1), puis traité par la RNase à 5µg/ml à 60°C pendant une heure. Ces étapes sont suivies de deux extractions additionnelles par PCI et d'une extraction au chlorophorme. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol absolu à -20°C, puis centrifugé, séché à l'air et repris dans un tampon TE-1x. La concentration et la pureté de cet ADN sont mesurées par spectrophotométrie à 230, 260 et 280nm avec un appareil GeneQuantII (Pharmacia, Upsalla, Sweden). Pour la construction de la mini-banque 10 génomique en pUC 18 (17), l'ADN a été totalement digéré pendant une nuit à 37°C par une série d'enzymes de restriction (BamHI, HindIII, EcoRI, EcoRV, PvuII, SalI, XbaI et XhoI) par simples et doubles digestions. Puis les 15 fragments d'ADN sont fractionnés sur gel d'agarose à 0,8% dans de TBE-1X et transférés sous vide sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham, UK). Ces membranes ont été 20 hybridées avec des sondes d'ADN préparées par PCR avec des amorces spécifiques sélectionnées à partir des gènes d'ADN polymérases de *P. furiosus*, *T. litoralis* et 25 *Pyrococcus* sp. GE23. Ces sondes sont préalablement marquées au ³²P par "random priming" conformément aux recommandations du fabricant (Megaprime, Amersham, UK). Deux sondes de *P. furiosus* ont été utilisées, Pfu et Pfu F, couvrant respectivement les régions délimitées par les 30 paires de bases 8 à 2316 et 819 à 1915 de la section codante du gène de la polymérase comme défini par Uemori et al. (18). Deux sondes de *T. litoralis*, Tli I et Tli T, couvrant respectivement les régions délimitées par les 35 paires de bases 297 à 1768 et 4631 à 5378, comme défini par Hodges et al. (9). Deux sondes de *Pyrococcus* sp GE23 ont été utilisées, l'une contenant la partie 5' du gène (fragment ClaI-HindIII

correspondant aux sites pb 8 et pb 1353 de la section codante) et l'autre contenant la partie terminale de ce même gène obtenu par PCR (amorces dites d'expression NdeI et SalI correspondant aux sites pb -1 et pb 2318, puis 5 digestion par XhoI et SalI comprenant les bases du n° 1879 à 2318). Les fragments positifs ont été identifiés par hybridation ADN-ADN (14). Seules les hybridations avec les sondes de *Pyrococcus* sp. GE 23 ont fourni des signaux positifs à 55°C en moins de 24 h d'exposition. 10 Les sondes issues de *T. litoralis* et de *P. furiosus* n'ont donné aucun résultat, même à 50°C dans un tampon standard sans formamide. A partir des hybridations avec les sondes de *Pyrococcus* sp. GE 23, des fragments HindIII de 1,9 kb ont été sélectionnés, puis préparés par une digestion 15 appropriée de 100µg d'ADN génomique, purifiés dans des sacs de dialyse à partir des gels d'agarose, et précipités à l'éthanol absolu après une extraction au PCI. Les fragments ont été ligaturés dans un pUC 18/HindIII déphosphorylé. Les transformations des souches 20 hôtes ont été réalisées par électroporation (Gene Pulser, Biorad). Le criblage des clones recombinants a été effectué par sélection à l'ampicilline, alpha-complémentation sur substrat X-Gal-IPTG puis hybridation de colonies selon les techniques standards (12). La 25 température des hybridations de colonies était de 55°C avec les sondes de *Pyrococcus* sp GE23, dans un tampon standard sans formamide. L'ADN plasmidique a été isolé selon la méthode décrite par Birnboim et Doly (1), puis purifié par chromatographie échangeuse d'anions en phase 30 solide (Quiagen, Chatsworth, Calif.). Les fragments de restriction des plasmides ont été purifiés sur gel d'agarose par la méthode du GeneClean (Bio 101, La Jolla, Calif.) pour un clonage ultérieur.

35 L'ARNr 16S et 23S de *Thermococcus fumicolans* a été amplifié par PCR en utilisant les amorces suivantes :
- amorce directe Aa: 5' TCCGGTTGATCCTGCCGGAA-3'
- amorce réverse 23Sa: 5'-CTTTCGGTCGCCCTACT-3'

- étape initiale 3 minutes à 94°C suivi de 30 cycles (94°C, 1mn/ 49°C, 1mn/ 72°C, 2mn) et, élongation finale de 5 mn à 72°C.

5 Le produit de PCR a été cloné dans le vecteur pUC18 pour séquençage ultérieur.

3) Séquençage des ADN.

10 Les séquences d'ADN ont été obtenues par la méthode de terminaison de chaîne (13) en utilisant un système d'analyses automatique d'ADN Applied Biosystems. Les deux brins des gènes codant pour l'ADN polymérase et les deux intéines ont été séquencés en utilisant des amorces universelles localisées sur des vecteurs ainsi que des amorces internes.

15 La séquence d'ADNr 16S a été réalisée sur les deux brins, après clonage (SureClone, Pharmacia, Uppsala, Sweeden), en utilisant le kit Hot-Tub (Amersham, UK.) afin de lever les compressions.

20 L'analyse de séquence a été réalisée avec le logiciel DNASTAR (Madison, Wis., USA) et le programme de Genetic Computer Group (University of Wisconsin Biotechnology Center, Wis., USA) accessible en ligne sur INFOBIOGEN. Les recherches informatisées de similitude ont été réalisées avec le programme BLAST, les 25 alignements multiples avec CLUSTAL V, et les arbres phylogénétiques ont été établis selon la méthode dite de "Neighbour-joining" (11).

30 4) Construction du recombinant exprimant l'ADN polymérase de *Thermococcus fumicola*ns.

35 L'ADN polymérase de *Thermococcus fumicola*ns ainsi que ses deux intéines, ont été exprimées en même temps chez *E. coli* avec le vecteur d'expression PARHS2 qui appartient à la famille des systèmes d'expression T7 (16) acquis auprès d'Eurogentec.

La PCR a été utilisée pour préparer le fragment complet de l'ADN polymérase et des deux intéines en

utilisant des amorces contenant les sites de restriction NdeI et BamHI :

- amorce Tfu Dir :

5'-TGG GGA TCC ATA TGA TCC TCG ATA CAG ACT ACA TC-3'

5 - amorce Tfu Rev :

5'-AAG CTT GGA TCC TCA TTT CTT CCC CAT TTT GAG CC-3'

Le mélange réactionnel contenait l'ADN polymérase GOLDSTAR (Eurogentec, B), l'enzyme Taq Extender (contenant la *Pfu* de Stratagene), le tampon d'extension avec les quatre dNTP (chacun à 0,2mM) et les amorces Tfu Dir et Tfu Rev à 50 pmoles dans un volume de 50µl final. L'amplification a été effectuée sur 20 cycles : 1 mn 94°C, 1 mn à 54°C et 6 mn à 72°C en utilisant un thermocycleur Stratagene 96-gradient. Les fragments de PCR ont ensuite été digérés par les enzymes NdeI et BamHI puis ligaturés aux mêmes sites du vecteur, rétablissant ainsi le codon d'initiation. La construction ainsi obtenue a été nommée PARHS2TFU1. Cette construction a été séquencée aux sites de jonction afin de vérifier son intégrité par rapport à la séquence de l'ADN génomique. Les tests d'expression ont été réalisés selon le protocole suivant: sélection des clones recombinants dans la souche *E. coli* Novablue, expression avec la souche BL21(DE3)pLysS dans un milieu 2xYT et induction de quatre heures à 1mM d'IPTG.

Les premiers essais d'induction ont été réalisés sur des cultures de 5 ml, induites ou non. Des précultures de nuit sont réalisées sans inducteur et relancées dans un milieu frais le matin (au dizième), jusqu'à ce que la densité optique (mesurée à 600nm) soit de 0,6, puis soit induites pendant 4 heures, soit non induites et arrêtées au bout de 2, 4 ou 14 heures. Quatre ml de cultures sont alors centrifugés à 4°C, 5000rpm pendant 10 minutes. Le culot est ensuite repris dans un tampon de lyse (Tris-HCl 10mM pH 7,5; NaCl 10mM, MgCl₂ 2 mM). Les cellules ainsi reprises sont alors lysées, soit avec du triton X-100 1% v/v, soit du lysozyme à 1mg/ml de

lyse et laissées sur glace environ 5 à 10 min. Les cellules sont ensuite thermodénaturées par une exposition de 20 min à 72°C. Ceci permet de détruire en grande partie les cellules de l'hôte mésophile sans détruire les protéines recombinantes. Le produit de lyse est ensuite centrifugé 20 min à 10 000rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré afin de le tester en incorporation, en PCR ou sur gel. Les incorporations sont réalisées suivant deux techniques :

10 - Avec de la thymidine tritiée comme traceur. L'incorporation est réalisée sur du thymus de veau activé (SIGMA Aldrich, F) dans le milieu de réaction suivant: Tris-HCl 50mM pH 8,8 ; DTT 1mM ; MgCl₂ 10mM ; KCl 10mM ; BSA 0,4 mg/ml; chaque dNTP à 0,4 mM.

15 - Avec du ³²P -dATP (Amersham) comme traceur. L'incorporation est réalisée sur de l'ADN thymus de veau activé (Appligene) dans le milieu de réaction suivant: Tris-HCl pH 9 50mM; KCl 50mM; MgCl₂ 7mM; BSA 0,2mg/ml et (NH₄)₂SO₄ (filtré) 16mM, avec un mélange des 4 dNTP à 500µM final chacun. Cette seconde méthode permet 20 d'estimer avec précision le nombre d'unités d'enzyme.

5) Purification.

25 a) Culture.

Après des essais en petits volumes, les cultures destinées à l'expression de l'enzyme recombinante ont été réalisées comme suit: production d'un inoculum de 700 ml (milieu 2x YT complémenté en 30 ampicilline et chloramphénicol) cultivé à 30°C jusqu'à DO = 0,8; ensemencement d'un fermenteur contenant 16 l du même milieu; culture pendant 4 h jusqu'à DO= 0,6, puis induction à l'IPTG 1 mM et culture pendant 4 h. La biomasse résultante est centrifugée 20 mn à 6 000 rpm à 35 4°C (Centrifugeuse JOUAN).

b) Lyse cellulaire et première étape de purification.

20 g de biomasse sont repris dans 80 ml de tampon (20 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 1% Triton x100; 2,2 mM PMSF). Le mélange résultant, maintenu à 4°C maximum, est soniqué à 12 reprises successives (cycle de 15 s) jusqu'à obtention d'une solution liquide. Le surnageant est ensuite centrifugé 20 mn à 4°C à 20 000 rpm (SORVALL Ti45). Le surnageant est récupéré et traité par la chaleur (70°C pendant 10 mn) afin de thermodénaturer l'essentiel des protéines natives de *E. coli*, puis centrifugé à nouveau.

c) Chromatographie.

15 Les 70 ml de surnageant issus de l'étape précédente sont chargés sur une colonne Pharmacia Héparine Sépharose (30 ml de résine), après équilibration avec un tampon A (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 0,5 mM EGTA; 5 mM MgCl₂; 10 mM β-mercaptopropanoïde; 0,2% Triton x100 et 10% 20 glycérol. Un lavage est effectué avec un tampon B (idem tampon A + 2 M NaCl) à raison de 0,3 ml/mn sur un système FPLC Pharmacia. Les différentes fractions sont récupérées en gradient de NaCl.

25 Les fractions actives ainsi récupérées sont dialysées pendant 5 h contre un tampon C: 10 mM Tris-Cl pH 7,5; 0,5 mM EGTA; 5 mM MgCl₂; 10 mM -mercaptopropanoïde; 0,2% Triton x100; 10% glycérol; 50 mM NaCl. Les produits issus de dialyse sont successivement chargés sur une colonne d'affinité pour les protéines se liant à l'ADN (Pharmacia, Bleue HiTrap) et élués en gradient de NaCl avec les mêmes tampons que précédemment.

30 30 ml de fractions actives obtenues précédemment sont chargées sur une colonne de phosphocellulose avec de la résine P11 de Whatmann (volume:20ml; diamètre: 2,5cm). Ces fractions ont été dialysées 5 heures contre le tampon suivant : KPO₄ pH7 20mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, Glycérol 5%, Triton X-100 0,1% et KCl 0,1M. Le débit de

la colonne est réglé à 0,2ml/min, le tampon A de chargement est composé de KPO4 pH7 20mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, Glycérol 5%, Triton X-100 0,1% et le gradient (entre 0% et 50% deB) est réalisé par le KCl présent dans tampon B à 2M.

Ayant déjà mis en évidence que cette polymérase ne se fixe pas sur une MonoQ ou une ressource Q et ce, quel que soit le pH utilisé, nous avons essayé de la récupérer en exclusion en faisant l'hypothèse d'une fixation de l'ADN contaminant par la colonne.

Tout d'abord un essai a été réalisé en sortie de la deuxième Bleue HiTrap avec un aliquot de 5ml et dialysé selon la même méthode que pour un passage sur une Bleue HiTrap.

Une deuxième tentative a été réalisée après la phosphocellulose et après deux dialyses des fractions les plus actives 45, 46 et 49. Les fractions sont tout d'abord chauffées 40 min à 85°C. Une première dialyse est alors réalisée contre le tampon KCl 0,1mM, K₂HPO₄ 1M pH7,5 pendant 3 heures. La deuxième dialyse est réalisée avec le tampon suivant : K₂HPO₄ pH 7,5 10mM, K₂PO₄ 10mM, KCl 25mM, DTT 1mM, Triton X-100 0,1%, Glycérol 10%, pendant 1 heure. La solution est alors chargée sur une colonne MonoQ à 0,5ml/min avec un gradient en NaCl de 0 à 20% (tampons utilisés pour l'Héparine).

6) Activités exonucléasiques.

Les tests d'exonuclease 3'-5' sont quantifiés par la libération de nucléotides marqués au ³²P.

A cette fin, une première étape permet de réaliser le marquage: l'ADN de est digéré par HindIII puis, le fragment de Klenow recopie l'ADN à partir des extrémités 3'-OH libres, dans un milieu contenant outre le tampon, l'ADN et l'enzyme, du ³²P dATP et du ³²P dTTP, les dGTPet dCTP étant froids. Après une heure à 37°C, les quatre dNTP froids sont rajoutés en excès pour une demi-

heure. La Klenow et les dNTP sont éliminés par une extraction au phénol et précipités à l'éthanol.

Les tests exonucléasiques sont effectués dans des solutions contenant les tampons des enzymes, 5 0,02mg/ml d'ADN marqué, et incubées toute la nuit à 72°C, 80°C et 95°C. Différents tampons contenant du MgCl₂ ou du MnSO₄ sont testés. Le même test est réalisé avec la Vent en témoin positif. 101 de solution de réaction sont alors 10 déposés sur papier DE81 (Watmann), séchés puis comptés avant et après lavage (3 fois 5 min avec du Na₂HPO₄, 1 fois à l'eau puis à l'éthanol à 95%) en utilisant la technique de Cerenkov.

Pour le test d'activité exonucléasique 5'-3', la réaction de marquage utilise la polynucléotide kinase 15 afin de marquer le substrat en 5'.

II - Résultats.

20 1) Isolement du gène de l'ADN polymérase de *Thermococcus fumicola* ainsi que des deux gènes d'intéines.

L'ADN de *Thermococcus fumicola*, digéré par une série d'enzymes de restriction, a été hybridé à des 25 sondes de *P. furiosus* et *T. litoralis*, préparées par PCR et aux sondes de *Pyrococcus* sp. GE23 obtenues lors du clonage de cette autre ADN polymérase (Dépôt de brevet n°96 08631 auprès de l'INPI). Comme montré dans les 30 figures 1a et 1b, l'hybridation de type Southern blot a révélé des fragments de deux types : un fragment HindIII-HindIII de 1,9 kb et un fragment XhoI-XhoI de 5 kb. Ces 35 deux fragments ont été révélés uniquement avec la sonde ClaI-HindIII du gène de *Pyrococcus* sp. GE23, marquée au ³²P avec une exposition de deux heures. Les deux fragments repérés ont ensuite été récupérés et purifiés comme décrit précédemment dans Matériel et Méthodes puis clonés dans le vecteur pUC18 déphosphorylé et digéré par HindIII ou dans le vecteur pBluescript déphosphorylé et

digéré par *Xho*I. Environ 400 recombinants (*E. Coli* SURE) ont été criblés avec la sonde *Clal*-*Hind*III. Sur ces 400 colonies, deux ont donné un signal positif lors de l'hybridation. (n° 9.26 et 12.79). Les deux clones ont été mis en culture en milieu LB-Amp et leurs profils de restriction étaient identiques, avec un insert de 1,8 kb. Le séquençage ultérieur de l'un de ces clones (désigné 557MACa) et la comparaison de séquence (Megaalign, programme DNASTAR) ont montré qu'il correspond à la 10 région promotrice et aux 1404 premières paires de base d'un gène d'une ADN polymérase appartenant à la famille B (2).

En ce qui concerne le fragment *Xho*I-*Xho*I de 5 kb, 700 recombinants ont été criblés sans aucun signal positif lors de l'hybridation. Cette absence de réussite pourrait être due à la présence d'une intéine au sein de ce fragment, le rendant alors instable dans un vecteur à haut nombre de copies de type pBluescript.

Après 12 heures d'exposition, un deuxième fragment *Hind*III-*Hind*III de 2 kb a été repéré par hybridation de type Southern sur la même membrane que précédemment, en utilisant comme sonde marquée la fin du gène de *Pyrococcus* sp. GE23 entre les sites *Xho*I et *Sal*I (fragment obtenu par digestion de produit de PCR). Ce 25 fragment a été cloné comme précédemment. Environ 200 clones recombinants ont été criblés et quatre d'entre eux ont donné un signal positif. Les quatres clones ont un profil identique après digestion par l'enzyme de restriction *Hind*III. L'un d'entre eux, 557MACc, a été 30 séquencé et la comparaison de séquence a démontré qu'il s'agissait de la fin du gène de l'ADN polymérase précédemment identifiée.

Supposant que les fragments de gènes obtenus appartenaient à la même ADN polymérase, des 35 oligonucléotides ont été utilisés afin d'amplifier la zone manquante. Ce fragment de PCR a ensuite été purifié sur gel comme décrit dans Matériel et Méthodes, et

utilisé comme sonde marquée radioactivement pour repérer sur la membrane le fragment manquant. Après deux heures de révélation un fragment HindIII-HindIII a été révélé, de 2 kb environ. Cloné comme précédemment, 600 colonies 5 ont alors été ciblées, donnant quatre clones positifs. Les quatre clones avaient le même profil et l'un d'entre eux, nommé 557MACb a été séquencé et les comparaisons de séquences ont démontré qu'il s'agit de la partie intermédiaire de l'ADN polymérase et ce fragment, 10 délimité par deux sites HindIII, s'insère parfaitement entre 557MACa et 557MACc. L'ensemble de ces trois clones donne la séquence complète de l'ADN polymérase de *T. fumicola*.

15 2) Position phylogénétique de *Thermococcus fumicola*

Thermococcus fumicola est une nouvelle espèce de Thermococcales décrite par Godfroy et al (8).

20 3) Séquences nucléotidiques et polypeptidiques de l'ADN polymérase de *Thermococcus fumicola*.

a) Séquences nucléotidiques

Les trois fragments délimités par des sites 25 HindIII ont été assemblés (figures 2 et 3). Ils forment à eux trois un fragment de 5039 paires de bases. Le premier fragment, issu du clone 557MACa, contient le codon de départ ATG en position 457 pb. La phase ouverte de lecture est alors ininterrompue sur 4572 paires de bases 30 jusqu'à rencontrer un codon STOP sur le fragment issu du clone 557MACc en position 5028 pb, six paires de bases avant le dernier site HindIII. Par alignement, avec les autres gènes d'ADN polymérases disponibles en banques (Pfu, Tli, GB-D, KOD, ...), avec la méthode CLUSTAL V, 35 complétée par un alignement manuel final nécessaire pour restituer les sites d'autoépissage des intéines, deux séquences d'insertions ont été mises en évidence.

- La première est insérée à la paire de base n° 1675 et se termine à 2754, étant ainsi répartie entre le fragment issu du clone 557MACa et celui du clone 557MACb.

5 - La deuxième est insérée à la base n° 3157 et se termine à 4323. Elle est, de même, répartie entre le clone 557MACb et 557MACc.

Ces deux séquences d'insertions forment, avec le reste de la séquence codant pour l'ADN polymérase, un seul cadre de lecture.

10

b) Séquences polypeptidiques.

15

La section codante du gène de l'ADN polymérase est donc constituée de trois parties disjointes. La première partie du gène, portée par 557MACa, comporte la zone codant pour l'exonucléase 3'-5', où après traduction, on reconnaît le motif FDIET. La deuxième partie, portée par 557MACb et la troisième partie portée par 557MACc comprennent les sites conservés SLYPSI, et YG.DTD.

20

25

30

Les deux séquences d'insertion sont situées sur des zones conservées de l'ADN polymérase, la première au site DFR/SLYPSII comme I-KOD-1 de *Pyrococcus* sp. KOD1 et la deuxième au site D/TDG comme I-Tli-1 de *T. litoralis*. Ces deux protéines sont libérées par autoépissage protéique. Elles comportent les sites de type LAGLIDADG répétés deux fois à 100 paires de bases de distance environ. Les alignements avec les autres intéines déposées dans les banques de séquences permettent de les assimiler à des endonucléases de restriction de type archaebactérien, endonucléases qui coupent l'ADN à l'endroit précis où leur gène s'insère.

35

c) Comparaison avec les autres séquences d'ADN polymérases.

L'alignement des différentes séquences polypeptidiques des ADN polymérases de Thermococcales disponibles en banque, *P. abyssi* strain GE5, *Pyrococcus*

sp. GE23, *Pyrococcus* sp. KOD1, *Pyrococcus* sp. GB-D, *P. furiosus*, *Pyrococcus* sp 9°N, *T. litoralis* avec la séquence de *T. fumicolans* (sans intéines), réalisé avec le programme CLUSTAL utilisant la matrice PAM250, donne 5 les niveaux de similarité entre ces diverses polymérases figurant au tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Espèce	1	2	3	4	5	6	7	8
1 - <i>T. fumicolans</i>	xxx	81,7	89,3	77,6	77,3	80,0	79,3	90,6
2 - <i>P. sp. GB-D</i>	xxx	81,3	85,1	76,9	89,0	88,1	82,6	
3 - <i>P. sp. KOD1</i>		xxx	78,8	77,5	80,7	79,9	90,3	
4 - <i>P. furiosus</i>			xxx	73,9	83,3	82,5	79,6	
5 - <i>T. litoralis</i>				xxx	75,9	75,0	76,5	
6 - <i>P. sp. GE23</i>					xxx	98,7	80,9	
7 - <i>P. abyssi</i>						xxx	80,2	
8 - <i>P. sp. 9°N</i>								xxx

10 Le niveau de similarité le plus proche est celui observé avec *Pyrococcus* sp. 9°N (90,6%), ce qui indique clairement que l'ADN polymérase de *T. fumicolans* est originale au niveau de sa séquence et constitue de ce fait une nouvelle ADN polymérase.

15 d) Comparaison des intéines avec les autres intéines disponibles dans les banques.

20 Les séquences disponibles en banque ont été alignées selon les mêmes méthodes que précédemment. Les comparaisons de l'ensemble des intéines démontrent que celles-ci sont réparties en trois groupes correspondant aux sites d'insertion des motifs A (R/SLYPSI), B (KILAN/S) et C (D/TDG). L'analyse des niveaux de similarité et la recherche de relations phylogénétiques n'ont de sens que pour des intéines appartenant à la même 25 classe, c'est à dire s'insérant dans un motif donné. Les niveaux de similarités pour I-Tfu-1 (classe A) et I-Tfu-2 (classe C) avec leurs intéines homologues déjà décrites sont donnés respectivement aux tableaux 2 et 3 ci-dessous.

30 Tableau 2

		1	2	3
1	I-Tfu-1	xxx	41,4	75,3
2	I-Mja-1		xxx	51,7
3	I-KOD-1			xxx

Tableau 3

		1	2
1	I-Tfu-1	xxx	62,2
2	I-I-Tfli-2		xxx

5 I-Tfu-1 et I-Tfu-2 semblent représenter deux nouveaux "allèles" des "homing" endonucléases archaebactériennes des classes A et C.

I-Tfu-1 est le troisième allèle connu d'intéine s'insérant au site A des ADN polymérase d'Archaea, tandis que I-Tfu-2 est le second de sa classe.

10

5) Expression, caractérisation et activité de l'ADN polymérase de *T. fumicola*ns.

a) Clonage et expression.

15

Un insert de 4595 pb obtenu par PCR longue-distance avec les amorces TfuDir et TfuRev et couvrant la totalité du gène de l'ADN polymérase de *Thermococcus fumicola*ns, avec les deux intéines, a été cloné aux sites NdeI et BamHI d'un vecteur pour transformer la souche *E. coli* Novablue. Des mini-préparations d'ADN plasmidique ont été réalisées sur une dizaine de clones transformants et ont toutes donné un signal positif à l'hybridation. Deux clones ont été retenus sur la base de leur profil après une digestion par NdeI et SalI ou par HindIII. Ces deux plasmides ont ensuite été transformés dans la souche *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

20

25

Des essais d'expression ont été réalisés en culture de 5 ml afin de déterminer les conditions optimales de culture et d'induction. Tout d'abord les essais de cultures ont été réalisés à 37°C, où l'on observe une lyse cellulaire trop importante, puis à 30°C où la culture ne lyse pratiquement pas. La culture est

30

réalisée en milieu 2xYT, où le rendement de production est meilleur et la lyse réduite, supplémenté avec de l'ampicilline (100 μ g/ml) et du chloramphénicol (15 μ g/ml). L'expression est alors induite en phase exponentielle de croissance ($D_{0600nm} = 0,6$ à 0,7) avec une concentration en IPTG de 1mM, concentration qui s'est avérée optimale. Des échantillons sont prélevés avant induction puis 2 heures, 4 heures et 6 heures après induction, ainsi qu'après une nuit. Des prélevements sont aussi réalisés sur les cultures non induites après 6, 8, 12 et 24 heures de culture.

Les échantillons sont alors traités comme indiqué au chapitre Matériel et Méthodes, afin de tester le niveau d'activité de l'ADN polymérase recombinante par incorporation de thymidine tritiée ou de ^{32}P dCTP. Cette première technique, qui permet une approche qualitative, nous donne deux types de comportement. Un des clones est non inductible et la meilleure activité est obtenue après une nuit de culture (clone rTfu1-1). Un second clone est inductible et présente une activité maximale après quatre heures d'induction, activité qui diminue par la suite (clone rTfu100-2). Deux autres clones, aussi testés sont faiblement inductibles et expriment très peu l'ADN polymérase.

Les clones rTfu1-1 et rTfu100-2 sont ensuite testés en erlenmeyer de 50 ml dans les conditions décrites précédemment. Seul le clone inductible rTfu100-2 a une expression constante en volume de 50 ml. La suite des travaux a donc été réalisée sur ce clone.

30

b) Fermentation et extraction des cellules.

La culture du clone Tfu100-2 a été réalisée dans un fermenteur de 16 litres, dans le milieu 2xYT supplémenté en ampicilline et chloramphénicol. La préculture, de 750ml a été réalisée la veille et arrêtée en phase exponentielle ($D_0 600nm= 0,7-0,8$) et laissée à 4°C pour la nuit. Le fermenteur a été préparé et mis en

température à 30°C avec le milieu de culture. La préculture a été remise à 30°C une heure avant son transfert dans le fermenteur. Le volume final de culture est de 15 litres. Les conditions sont les suivantes:

5 température = 30°C ; agitation = 300 rpm. L'induction avec 1 mM d'IPTG a été réalisée à DO 600 = 0,58. Le pH de la culture a été réglé à 7 pendant la phase d'acidification puis laissé libre lors de la phase alcaline. Les bactéries ont été prélevées après quatre

10 heures d'induction, alors que le pH était de 8,3. La culture a ensuite été centrifugée puis les cellules ont été divisées en trois lots. L'un d'eux, 20 g de pâte, a été repris dans 80 ml de tampon de lyse pour un traitement ultérieur indiqué au chapitre Matériel et

15 méthodes.

c) Purification de l'ADN polymérase de *T. fumicola*ns.

La purification a été effectuée comme indiqué précédemment (Matériel et Méthodes). Pour la colonne Héparine -Sépharose, un gradient de 3 à 50% de tampon B, correspondant aux volumes 365 ml à 1363 ml, permet de récupérer 73 fractions de 6 ml. Le pic d'activité de la polymérase est obtenu pour une valeur de gradient de 0,5 M environ, et correspond aux fractions 55/56 (dosées à 10 et 12 unités respectivement) comme indiqué à la figure 7. Ces fractions, incubées à 37°C pendant la nuit en présence d'ADN de pBR322, dégradent l'ADN et présentent en conséquence des traces de nucléase de l'hôte, non visibles sur gel. Leur élimination, ou tout au moins une réduction substantielle de leur concentration a été réalisée par un passage sur colonne d'affinité (Bleue Hitrap).

Les fractions 54 à 60, regroupées et dialysées, sont chargées à raison de 0,25 ml/mn. L'élution permet de récupérer 65 fractions de 5 ml avec des pics d'activité pour les fractions 36 à 56. Le dosage de

l'activité fait apparaître une concentration de 3 à 5 unités pour les fractions 36 à 40. Ces fractions, mises en présence d'ADN à 37°C, présentent une faible activité nucléasique.

5 Néanmoins, l'activité sur le plasmide pBR322 à 37°C toute la nuit montre une nette amélioration de la pureté de l'enzyme. Une deuxième colonne Bleue HiTrap a été réutilisée en prenant les fractions 36 à 44 et dialysées comme précédemment. 25ml sur les 30ml de fraction ont été injectés sur la colonne avec un débit de 0,25ml/min (5 ml étant gardés pour essayer une MonoQ).
10 Après cette deuxième colonne Bleue HiTrap, l'activité sur le plasmide pBR322 fermé et incubé toute la nuit avec des fractions de la colonne, est nulle. L'incubation d'une heure à 72°C de fractions avec l'ADN de Lambda digéré par HindIII montre une très nette dégradation, mettant en évidence l'activité exonucléase 3'-5' associée à notre ADN polymérase. Le pic d'activité se situe entre les fractions 27 et 32. L'ADN polymérase plus pure est donc
15 sortie plus tôt sur le gradient de NaCl. Sur les fractions les plus actives, un comptage a été réalisé donnant une activité supérieure à 5U/μl pour les fractions 29, 30 et 31. La figure 4 montre le résultat sur gel SDS-PAGE. Suite à ces trois colonnes, la pureté de la polymérase est nettement améliorée. Néanmoins, il
20 reste des traces d'ADN de *E.coli* fixé à la polymérase et mises en évidence par PCR. Deux colonnes supplémentaires vont donc être mis en oeuvre. 30ml de fractions actives obtenues précédemment sont chargées sur une colonne de phosphocellulose (celle-ci devrait fixer différemment
25 l'ADN et la polymérase). L'activité de la polymérase est repérée par son activité exonucléasique 3'-5' élevée à 72°C sur l'ADN de Lambda digéré par HindIII. L'activité la plus forte se situe entre les fractions 40 et 49 avec un pic net en 46 et 47. Sur ces fractions 40 à 49 l'ADN de pBR322 est intact après une nuit à 37°C. La figure 5 nous montre les résultats sur gel avec des activités
30

35

mesurées de 6U/ μ l pour la fraction 46, 4,5U/ μ l pour la 47 et 3U/ μ l pour la 48. Néanmoins il reste encore des traces d'ADN de *E. coli*.

5 Ayant déjà mis en évidence que cette polymérase ne se fixe pas sur une MonoQ ou une ressource Q et ce quel que soit le pH utilisé, nous avons essayé de la récupérer en exclusion en espérant une fixation de l'ADN contaminant par la colonne.

10 Tout d'abord un essai a été réalisé en sortie de la deuxième Bleue HiTrap avec 5ml dialysés. Les résultats ont été décevants, les fractions d'exclusion étant peu actives en incorporation.

15 Une deuxième tentative a été réalisée après la phosphocellulose et après deux dialyses des fractions les plus actives 45, 46 et 49. Les fractions sont tout d'abord chauffées 40 min à 85°C en raison d'une détection de contaminant dégradant le pBR322 à 72°C en une nuit. Aucune flocculation n'est alors visible et l'extrait est mis sur glace. Un nouveau test démontre que la contamination semble réduite. Après les dialyses et le passage sur colonne, l'activité exonucléasique est mise en évidence sur les fractions d'exclusion 3 à 7. L'activité est dosée à 2U/ μ l et l'enzyme est visualisée sur la figure 10. Suite à cette dernière étape de 20 purification, nous avons obtenu des résultats positifs en PCR et comparables à ceux obtenus pour la Vent.

25

d) Caractérisation des activité des fractions purifiées.

30 L'activité de l'ADN polymérase des différentes fractions a été dosée par incorporation au 32 P dATP selon le protocole décrit en Matériel et Méthodes.

35 - Amplification de gènes in vitro.
Un fragment de 459 pb a été amplifié à partir d'un ADN génomique d'Archaeobactérie (*Thermococcus* sp. GE

8) avec des amorces spécifiques. Différents tampons ont été utilisés:

- tampon 10x R: Tris HCl pH 8,8: 300mM; KCl: 500mM; MgCl₂: 30mM; Tween 20: 0,1%

5 - tampon 10x H: Tris HCl: pH 8,8: 300 mM; KCl: 500mM; MgCl₂: 15mM; Tween 20: 0,1%

- tampon 10x T: Tris HCl pH 8,8: 600mM; KCl: 500mM; MgCl₂: 15mM; Tween 20: 0,1%

10 - tampon 10x S: Tris HCl pH 8,8: 200mM; KCl: 250mM; MgCl₂: 20mM; Tween 20: 0,1%

Trente cycles ont été réalisés, chacun comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec., une étape d'hybridation des amorces à 51°C pendant 1 min. puis une étape d'elongation à 72°C pendant 2 min. 15 La figure 8 présente les résultats obtenus avec un volume réactionnel de 50 µl pour des quantités d'ADN polymérase de *Thermococcus fumicola*s de 2,7 unités. En l'état actuel, les meilleurs résultats avec la Tfu sont obtenus avec le tampon R.

20 La figure 9 représente les résultats de l'amplification d'un fragment de 1,6 kb avec la Tfu purifiée sur colonnes d'héparine puis de séphacryl-bleue, et un tampon réactionnel 10x ayant la composition suivante: Tris HCl pH 8,8: 200mM; KCl: 100mM; (NH₄)₂SO₄: 100mM; MgSO₄: 20mM; Triton X-100: 1%.

25

- Activité exonucléasique.

30

Les tests d'activité, selon le protocole détaillé en Matériels et Méthodes, ne révèlent pas d'activité exonucléasique 5'-3' chez la Tfu. Ceci est en conformité avec la structure de l'enzyme déduite de l'analyse de la séquence polypeptidique qui ne fait pas apparaître de domaine fonctionnel exonucléase 5'-3', contrairement à ce qui est observé pour DNA polI de *E. coli* et la Tag.

35 Les tests d'activité, selon le protocole détaillé au chapitre Matériels et Méthodes, font

apparaître une activité exonucléasique 3'-5' (activité proof-reading ou de correction d'erreurs) chez la Tfū, à un niveau sensiblement égal à celui de la Vent comme montré dans le tableau 4 ci-dessous. Le tableau 4 rapporte la mesure de l'activité exonucléasique 3'-5' de la Tfū en fonction de la concentration en dNTP, et en comparaison avec la Vent.

Tableau 4

Conc. dNTP (mM)	Tfū	Témoin + (Vent)	Témoin - (Pab exo-)
0	30 000	25 000	100 000
0,1	40 000	-	
0,2	40 000	56 000	
0,3	40 000	58 000	
0,4	40 000	70 000	
0,5	-	-	
0,75	40 000	84 000	
1	90 000	106 000	100 000

10 Ces résultats sont en conformité avec la structure de l'enzyme déduite de l'analyse de la séquence polypeptidique qui révèle la présence d'un domaine exonucléasique 3'-5' en position N-terminale, ainsi que la présence des motifs catalytiques caractéristiques de ce domaine. La Tfū est sensible à une concentration de 15 l'ordre de 0,8 mM de dNTP, tandis que la Vent manifeste une sensibilité dès 0,5 mM. Cette activité est connue pour améliorer *in vitro* la fidélité des polymérases utilisées en PCR.

20 En outre, cette activité exonucléasique est confirmée par un test plus simple. Les fractions purifiées, dépourvues d'activité nucléasique à 37°C, mises en présence d'ADN de digéré par HindIII puis exposé à 72°C pendant la nuit, dégradent complètement cet 25 ADN, mettant ainsi en évidence la présence de l'activité 3'-5' exonucléase de la Tfū ainsi que sa thermostabilité.

- Thermostabilité.

La thermostabilité mesurée selon le protocole décrit précédemment (Matériel et Méthodes), ou mieux, l'activité résiduelle en incorporation à 72°C après exposition de l'enzyme à des températures élevées pendant 5 des temps variables, est donnée dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5

Température (°C)	Demi-vie polymérase	Activité exo après 3h
92	-	100%
95	4 h	
100	2 h	

10 Cette thermostabilité, inférieure à celle des polymérases issues d'organismes plus hyperthermophiles tels que les *Pyrococcus*, n'en demeure pas moins très largement supérieure à celles des polymérases issues des *Thermus* et en particulier toutes les Taq. La thermostabilité de l'enzyme recombinante purifiée, tant 15 pour le domaine polymérase que pour l'exonucléase, est de toute manière très largement supérieure à tous les besoins connus en PCR.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7:1503.
- 5 2. Braithwaite, D. K., and J. Ito. 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*. 21(4):787-802.
3. Charbonnier, F. 1993. Paris Sud.
- 10 4. Chong, S. R., Y. Shao, H. Paulus, J. Benner, F. B. Perler, and M. Q. Xu. 1996. Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein - The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system. *Journal of Biological Chemistry*. 271(36):22159-22168.
- 15 5. Davis, E. O., S. G. Sedgwick, and J. Colston. 1991. Novel structure of *Mycobacterium tuberculosis* implies processing of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 173(18):5653-5662.
- 20 6. Davis, E. O., S. G. Sedgwick, and M. J. Colston. 1991. Novel structure of the *recA* locus of *Mycobacterium tuberculosis* implies processing of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 173(18):5653-5662.
- 25 7. Fsihi, H., V. Vincent, and S. T. Cole. 1996. Homing events in the *gyrA* gene of some mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(8):3410-3415.
- 30 8. Godfroy, A., J. R. Meunier, J. Guézennec, F. Lesongeur, G. Raguénès, A. Rimbault, and G. Barbier. 1996. *Thermococcus fumicolans* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the North Fiji Basin. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46(4):1113-1119.
- 35 9. Hodges, R. A., F. B. Perler, C. J. Noren, and W. E. Jack. 1992. Protein Splicing Removes

Intervening Sequences in an Archaea DNA Polymerase.
Nucleic Acids Res. 20(23):6153-6157.

10. Kong, H. M., R. B. Kucera, and W. E. Jack. 1993. Characterization of a DNA Polymerase from the Hyperthermophile Archaea *Thermococcus litoralis* - Vent DNA Polymerase, Steady State Kinetics, Thermal Stability, Processivity, Strand Displacement, and Exonuclease Activities. J Biol Chem. 268(3):1965-1975.
11. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4(4):406-425.
12. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
13. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5467-5473.
14. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of molecular biology. 98:503.
15. Southworth, M. W., H. Kong, R. B. Kucera, J. Ware, H. W. Jannasch, and F. B. Perler. 1996. Cloning of thermostable DNA polymerases from hyperthermophilic marine Archaea with emphasis on *Thermococcus* sp. 9°N-7 and mutations affecting 3'-5' exonuclease activity. Proc. Ntl. Acad. Sci. USA. 93:5281-5285.
16. Studier, F. W., A. H. Rosenberg, F. J. Dunn, and J. W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 185:60-89.
17. Sutherland, K. J., C. M. Henneke, P. Towner, and D. W. Hough. 1990. Citrate synthase from the thermophilic archaeabacterium *Thermoplasma acidophilum*. Cloning and sequencing of the gene. European Journal of Biochemistry. 194:839-844.

18. Uemori, T., Y. Ishino, H. Toh, K. Asada, and I. Kato. 1993. Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. Nucleic Acids Research. 21(2):259-265.

LISTE DE SÉQUENCES

(1) INFORMATION GÉNÉRALES :

- (i) DEPOSANT : APPLIGENE - ONCOR
- (ii) TITRE DE L'INVENTION: ADN POLYMERASE THERMOSTABLE D'ARCHAEBACTÉRIES DE L'ESPECE *THERMOCOCCUS fumicola*ns
- (iii) NOMBRE DE SÉQUENCES: 4

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:1 :

- (i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 5039 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRIN: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN
- (ix) CARACTÉRISTIQUES
 - (A) NOM/CLE: séquence codante de l'ADN polymérase de *THERMOCOCCUS fumicola*ns Tfu
 - (B) EMPLACEMENT: de 457 à 5028
- (ix) CARACTÉRISTIQUES
 - (A) NOM/CLE: séquence codante de l'intéine I-Tfu-1
 - (B) EMPLACEMENT: de 1675 à 2754
- (ix) CARACTÉRISTIQUES
 - (A) NOM/CLE: séquence codante de l'intéine I-Tfu-2
 - (B) EMPLACEMENT: de 3157 à 4323
- (ix) CARACTÉRISTIQUES
 - (A) NOM/CLE: codon stop
 - (B) EMPLACEMENT: de 5026 à 5028
- (xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE: SEQ ID NO:1 :

AGCTTAAAGC GTCCGCCACT ACTTCCTGAA AGCTCACGCG GTAAAACAGC TCCATGCTCG	60
GCTCTTCGAT GGGAGGTTTA AAAAGGTGGT GGTGAGGTTT ATTAGGAAGA AGGCTCAACT	120
AGAGACGGTG GGAGTATGGA AGAGGTGAC AGGCTCGTGT TCAACTTCC CCTCTTCAA	180
GATTACTGGG AAAAGGAGCG GTTCCTCAAG GTCGTTGGC TTCTGGTGAG CCACCAGATA	240
ACGTTTGAGA AAGCTGCCGA GCTTCTGGAC ATGAGGCTCG AAGAGCTGGC GTTCCTCC	300
GACAAGCTCG GCGTTGAGTA CTCGCTTCTT GATGATGAAG AGGCCAGACT TGAGAGAGAA	360
GAGGCCAATA AGCTCATGGG GGAAATGAAG GGTGGAGCGT TTGTCTGATT CTTCTGAGCT	420
GTTATTGGTG TTTCACAGGC TCGGACGGTGC TGGATT ATG ATC CTC GAT ACA GAC	474
Met Ile Leu Asp Thr Asp	
1	5
TAC ATC ACC GAA GAC GGA AGG CCC GTC ATC AGG GTG TTC AAG AAG GAG	522
Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Arg Pro Val Ile Arg Val Phe Lys Lys Glu	
10	15
	20

AAC GGC GAG TTC AAA ATC GAG TAC GAC AGG GAC TTC GAG CCT TAC ATC Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg Asp Phe Glu Pro Tyr Ile 25 30 35	570
TAC GCT CTC CTG AAG GAC GAT TCC GCG ATC GAG GAC GTC AAG AAG ATA Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile Glu Asp Val Lys Lys Ile 40 45 50	618
ACT GCA AGC CGG CAC CGT ACC ACC GTC AGG GTC GTC AGG GCC GGG AAG Thr Ala Ser Arg His Gly Thr Thr Val Arg Val Val Arg Ala Gly Lys 55 60 65 70	666
GTG AAG AAG AAG TTC CTC GGC AGG CCG ATA GAG GTC TGG AAG CTC TAC Val Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile Glu Val Trp Lys Leu Tyr 75 80 85	714
TTC ACC CAT CCC CAG GAC GTT CCG GCA ATC AGG GAC AAA ATC AGG GAG Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile Arg Asp Lys Ile Arg Glu 90 95 100	762
CAC CCT GCC GTG GTC GAC ATA TAT GAG TAC GAC ATA CCC TTT GCC AAG His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr Asp Ile Pro Phe Ala Lys 105 110 115	810
CGC TAC CTC ATC GAT AAG GGC CTC ATC CCG ATG GAG GGC GAC GAG GAG Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro Met Glu Gly Asp Glu Glu 120 125 130	858
CTC AAG ATG CTC GCC TTC GAC ATC GAG ACG CTC TAC CAC GAG GGC GAG Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr Leu Tyr His Glu Gly Glu 135 140 145 150	906
GAG TTC GCC GAG GGG CCT ATT CTT ATG ATA AGC TAT GCC GAC GAG GAA Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile Ser Tyr Ala Asp Glu Glu 155 160 165	954
GGG GCG AGG GTA ATA ACC TGG AAG AAG ATC GAC CTT CCC TAC GTT GAC Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile Asp Leu Pro Tyr Val Asp 170 175 180	1002
GTC GTT TCA ACG GAG AAG GAG ATG ATA AAG CGC TTC CTG AAG GTT GTC Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys Arg Phe Leu Lys Val Val 185 190 195	1050
AAG GAG AAG GAC CCC GAT GTC CTC ATA ACC TAC AAC GGC GAC AAC TTC Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe 200 205 210	1098
GAC TTC GCT TAC CTC AAG AAG CGC TCC GAG AAG CTC GGC GTT AAG TTC Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu Lys Leu Gly Val Lys Phe 215 220 225 230	1146
ATC CTC GGA AGG GAC GGC AGC GAG CCG AAG ATA CAG AGG ATG GGC GAC Ile Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys Ile Gln Arg Met Gly Asp 235 240 245	1194
CGC TTC GCC GTC GAG GTG AAG GGA AGA ATA CAC TTC GAC CTC TAC CCC Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile His Phe Asp Leu Tyr Pro 250 255 260	1242

GTC ATA AGA CAC ACC ATC AAC CTG CCC ACC TAC ACG CTG GAG GCC GTC Val Ile Arg His Thr Ile Asn Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Glu Ala Val 265 270 275	1290
TAC GAG GCG ATT TTT GGG CAG CCA AAG GAG AAG GTC TAC GCT GAG GAG Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Gln Pro Lys Glu Lys Val Tyr Ala Glu Glu 280 285 290	1338
ATA GCG CAG GCC TGG GAA ACG GGC GAG GGG CTT GAG CGC GTC GCG CGC Ile Ala Gln Ala Trp Glu Thr Gly Glu Gly Leu Glu Arg Val Ala Arg 295 300 305 310	1386
TAC TCG ATG GAG GAC GCC AAG GTA ACC TAC GAG CTG GGA AGG GAG TTC Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr Glu Leu Gly Arg Glu Phe 315 320 325	1434
TTC CCG ATG GAG GCC CAA CTT TCT CGG CTG GTC GGT CAG AGC TTC TCG Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu Val Gly Gln Ser Phe Trp 330 335 340	1482
GAC GTC TCG CGC TCC AGC ACC GGC AAC CTC GTC GAG TGG TAC CTC CTC Asp Val Ser Arg Ser Thr Gly Asn Leu Val Glu Trp Tyr Leu Leu 345 350 355	1530
AGG AAG GCC TAC GAG AGG AAC GAG CTG GCA CCG AAC AAG CCC TCC GGC Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala Pro Asn Lys Pro Ser Gly 360 365 370	1578
AGA GAA CTT GAG AGG CGC CGC GGG GGC TAC GCC GGC GGC TAC GTC AAG Arg Glu Leu Glu Arg Arg Gly Gly Tyr Ala Gly Gly Tyr Val Lys 375 400 405 410	1626
GAG CCG GAG AGG GGA CTT TGG GAG AAC ATA GCT TAT TTA GAT TTT AGG Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile Ala Tyr Leu Asp Phe Arg 415 420 425	1674
<u>TGT</u> CAT CCT GCC GAC ACT AAA GTC ATT GTC AAA GGG AAG GGC GTT GTA Cys His Pro Ala Asp Thr Lys Val Ile Val Lys Gly Lys Gly Val Val 430 435 440	1722
AAC ATC AGC GAA GTT AGG GAG GGG GAC TAC GTT CTC GGC ATA GAC GGC Asn Ile Ser Glu Val Arg Glu Gly Asp Tyr Val Leu Gly Ile Asp Gly 445 450 455	1770
TGG CAG AAG GTT CAA AGG GTC TGG GAG TAT GAT TAC GAG GGA GAA CTC Trp Gln Lys Val Gln Arg Val Trp Glu Tyr Asp Tyr Glu Gly Glu Leu 460 465 470	1818
GTA AAT ATA AAC GGC CTT AAG TGC ACA CCG AAC CAT AAG CTT CCG GTC Val Asn Ile Asn Gly Leu Lys Cys Thr Pro Asn His Lys Leu Pro Val 475 480 485 490	1866
GTT AGG AGG ACT GAG AGG CAG ACT GCG ATA AGG GAC AGC CTT GCA AAG Val Arg Arg Thr Glu Arg Gln Thr Ala Ile Arg Asp Ser Leu Ala Lys 495 500 505	1914
TCT TTT CTC ACG AAA AAA GTT AAA GGT AAG CTG ATA ACC ACG CCT CTC Ser Phe Leu Thr Lys Lys Val Lys Gly Lys Leu Ile Thr Thr Pro Leu 510 515 520	1962

TTT GAA AAA ATC GGG AAG ATC GAG CGA GAG GAC GTG CCA GAA GAG GAG Phe Glu Lys Ile Gly Lys Ile Glu Arg Glu Asp Val Pro Glu Glu Glu 525 530 535	2010
ATA CTC AAA GGA GAA CTC GCC GGA ATA ATC CTG GCT GAG GGC ACA CTC Ile Leu Lys Gly Glu Leu Ala Gly Ile Ile Leu Ala Glu Gly Thr Leu 540 545 550	2058
CTG AGA AAG GAT GTC GAG TAC TTT GAC TCT TCC AGA GGG AAG AAG AGA Leu Arg Lys Asp Val Glu Tyr Phe Asp Ser Ser Arg Gly Lys Lys Arg 555 560 565 570	2106
GTA TCA CAC CAG TAC AGG GTT GAA ATA ACC GTT GGG GCG CAG GAG GAG Val Ser His Gln Tyr Arg Val Glu Ile Thr Val Gly Ala Gln Glu Glu 575 580 585	2154
GAC TTC CAG AGG AGG ATC GTT TAC ATT TTC GAA CGC CTC TTT GGG GTA Asp Phe X Arg Arg Ile Val Tyr Ile Phe Glu Arg Leu Phe Gly Val 590 595 600	2202
ACT CCC AGT GTT TAC CGG AAA AAG AAC ACA AAC GCA ATA ACG TTC AAA Thr Pro Ser Val Tyr Arg Lys Lys Asn Thr Asn Ala Ile Thr Phe Lys 605 610 615	2250
GTT GCC AAA AAA GAG GTT TAT CTT AGG GTT AGG GAA ATT ATG GAT GGC Val Ala Lys Lys Glu Val Tyr Leu Arg Val Arg Glu Ile Met Asp Gly 620 625 630	2298
ATT GAG AAC CTC CAC GCT CCT TCT GTG TTA AGG GGC TTT TTT GAA GGA Ile Glu Asn Leu His Ala Pro Ser Val Leu Arg Gly Phe Phe Glu Gly 635 640 645 650	2346
GAC GGA AGC GTC AAC AAG GTC CGG AAG ACA GTG GTA GTG AAT CAG GGC Asp Gly Ser Val Asn Lys Val Arg Lys Thr Val Val Val Asn Gln Gly 655 660 665	2394
ACC AAT AAT GAA TGG AAA ATT GAA GTG GTG TCA AAA CTC CTC AAC AAG Thr Asn Asn Glu Trp Lys Ile Glu Val Val Ser Lys Leu Leu Asn Lys 670 675 680	2442
TTG GGG ATT CCG CAT AGA AGG TAC ACA TAC GAT TAC ACC GAA AGA GAA Leu Gly Ile Pro His Arg Arg Tyr Thr Tyr Asp Tyr Thr Glu Arg Glu 685 690 695	2490
AAA ACC ATG ACA ACG CAT ATA CTT GAG ATA GCC GGC AGG GAT GGG TTA Lys Thr Met Thr Thr His Ile Leu Glu Ile Ala Gly Arg Asp Gly Leu 700 705 710	2538
ATC CTT TTC CAG ACC ATT GTG GGA TTC ATA AGC ACT GAG AAG AAC ATG Ile Leu Phe Gln Thr Ile Val Gly Phe Ile Ser Thr Glu Lys Asn Met 715 720 725 730	2586
GCG CTG GAG GCA ATC AGG AAC AGG GAA GTG AAC CGC CTA GAA AAC Ala Leu Glu Ala Ile Arg Asn Arg Glu Val Asn Arg Leu Glu Asn 735 740 745	2634
AAT GCC TTC TAT ACC CTA GCC GAC TTT ACG GCG AAG ACA GAG TAC TAC Asn Ala Phe Tyr Thr Leu Ala Asp Phe Thr Ala Lys Thr Glu Tyr Tyr 750 755 780	2682

AAG GGC AAA GTT TAC GAC TTA ACC CTT GAG GGA ACG CCC TAT TAC TTC Lys Gly Lys Val Tyr Asp Leu Thr Leu Glu Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe 785 790 795	2730
GCC AAT GGC ATA CTG ACC CAC AAT <u>TCG</u> CTA TAT CCT TCG ATT ATA ATT Ala Asn Gly Ile Leu Thr His Asn Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile 800 805 810	2778
TCC CAC AAC GTC TCC CCC GAT ACG CTC AAC CGC GAG GGC TGC GGG GAG Ser His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Gly Glu 815 820 825 830	2826
TAC GAC GAG GCT CCG CAG GTA GGG CAT CGC TTT TGT AAG GAC TTC CCC Tyr Asp Glu Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro 835 840 845	2874
GGC TTC ATC CCC AGC CTC CTC GGT GAC CTG CTC GAC GAG AGG CAG AAG Gly Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Asp Glu Arg Gln Lys 855 860 865	2922
GTA AAG AAG CAC ATG AAG GCC ACG GTG GAC CCG ATA GAG AAG AAG CTC Val Lys Lys His Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Ile Glu Lys Lys Leu 870 875 880	2970
CTC GAT TAC AGG CAG CGC GCA ATT AAA ATC CTC GCC AAC AGC TTC TAC Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr 885 890 895	3018
GGC TAC TAT GGC TAC GCA AAG GCC CGC TGG TAC TGC AAG GAG TGC GCC Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala 900 905 910 915	3066
GAG AGC GTT ACC GCC TGG GGC AGG CAG TAC ATT GAG ACC ACC ATG AGG Glu Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg Gln Tyr Ile Glu Thr Thr Met Arg 920 925 930	3114
GAA ATA GAG GAA AAA TTT GGC TTT AAA GTG CTG TAC GCG GAT <u>AGT</u> GTT Glu Ile Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Ser Val 935 940 945	3162
ACA GGG GAC ACA GAG GTA ACC ATC AGA AGA AAC GGC AGG ATT GAG TTC Thr Gly Asp Thr Glu Val Thr Ile Arg Arg Asn Gly Arg Ile Glu Phe 950 955 960	3210
GTT CCA ATC GAG AAA CTC TTT GAG CGC GTT GAT CAC CGT GTT GGT GAG Val Pro Ile Glu Lys Leu Phe Glu Arg Val Asp His Arg Val Gly Glu 965 970 975	3258
AAG GAG TAC TGC GTT CTT GGA GGG GTT GAG GCA CTG ACA CTC GAC AAC Lys Glu Tyr Cys Val Leu Gly Gly Val Glu Ala Leu Thr Leu Asp Asn 980 985 990 995	3306
AGG GGC AGG CTC GTG TGG AAG AAG GTT CCG TAC GTC ATG AGA CAT AAA Arg Gly Arg Leu Val Trp Lys Lys Val Pro Tyr Val Met Arg His Lys 1000 1005 1010	3354
ACG GAC AAA AGA ATC TAT AGG GTA TGG TTC ACC AAC TCT TGG TAC CTT Thr Asp Lys Arg Ile Tyr Arg Val Trp Phe Thr Asn Ser Trp Tyr Leu 1015 1020 1025	3402

GAC GTG ACG GAG GAT CAC TCG CTA ATA GGC TAC CTG AAC ACA AGC AAA Asp Val Thr Glu Asp His Ser Leu Ile Gly Tyr Leu Asn Thr Ser Lys 1030 1035 1040	3450
GTC AAA CCC GGA AAG CCC TTG AAA GAG CGT CTC GTC GAG GTC AAG CCA Val Lys Pro Gly Lys Pro Leu Lys Glu Arg Leu Val Glu Val Lys Pro 1045 1050 1055	3498
GAA GAA TTG GGG GGT AAG GTC AAG TCT CTC ATT ACG CCC AAT CGG CCA Glu Glu Leu Gly Lys Val Lys Ser Leu Ile Thr Pro Asn Arg Pro 1060 1065 1070 1075	3546
ATT GCC CGT ACC ATC AAG GCC AAC CCC ATT GCC GTC AAG CTC TGG GAG Ile Ala Arg Thr Ile Lys Ala Asn Pro Ile Ala Val Lys Leu Trp Glu 1080 1085 1090	3594
TTA ATT GGC CTG CTG GTG GGA GAT GGC AAC TGG GGT CGA CAA TCG AAC Leu Ile Gly Leu Leu Val Gly Asp Gly Asn Trp Gly Gly Gln Ser Asn 1095 1100 1105	3642
TGG GCC AAA TAC TAC GTT GGC CTC TCC TGT GGG CTG GAT AAA GCC GAA Trp Ala Lys Tyr Tyr Val Gly Leu Ser Cys Gly Leu Asp Lys Ala Glu 1110 1115 1120	3690
ATA GAG AGA AAA GTC CTG AAC CCT TTA AGA GAG GCA AGC GTC ATC TCC Ile Glu Arg Lys Val Leu Asn Pro Leu Arg Glu Ala Ser Val Ile Ser 1125 1130 1135	3738
AAC TAC TAC GAC AAG AGC AAG AAG GGC GAC GTT TCC ATA CTC TCC AAG Asn Tyr Tyr Asp Lys Ser Lys Lys Gly Asp Val Ser Ile Leu Ser Lys 1140 1145 1150 1155	3786
TGG CTC GCC GGA TTC ATG GTC AAA TAC TTC AAA GAT GAA AAT GGG AAC Trp Leu Ala Gly Phe Met Val Lys Tyr Phe Lys Asp Glu Asn Gly Asn 1160 1165 1170	3834
AAG GCC ATT CCC AGC TTC ATG TTC AAC CTT CCA AGG GAA TAC ATA GAG Lys Ala Ile Pro Ser Phe Met Phe Asn Leu Pro Arg Glu Tyr Ile Glu 1175 1180 1185	3882
GCC TTT CTA CGG GGG CTG TTT TCA GCG GAC CGA ACG GTA AGC TTG CGT Ala Phe Leu Arg Gly Leu Phe Ser Ala Asp Gly Thr Val Ser Leu Arg 1190 1195 1200	3930
AGA GGA ATC CCA GAA ATT AGA CTG ACA AGC GTT AAC AGA GAG CTT AGT Arg Gly Ile Pro Glu Ile Arg Leu Thr Ser Val Asn Arg Glu Leu Ser 1205 1210 1215	3978
GAT GCC GTG AGA AAG TTG CTG TGG CTG GTT GGG GTC TCC AAC TCA CTA Asp Ala Val Arg Lys Leu Leu Trp Leu Val Gly Val Ser Asn Ser Leu 1220 1225 1230 1235	4026
TTC ACC GAA ACC AAG CCA AAC CGG TAC CTG GAG AAA GAA AGT GGA ACG Phe Thr Glu Thr Lys Pro Asn Arg Tyr Leu Glu Lys Glu Ser Gly Thr 1240 1245 1250	4074
CAT TCG ATT CAC GTG AGG ATA AAG AAC AAG CAT CGC TTT GCC GAT AGA His Ser Ile His Val Arg Ile Lys Asn Lys His Arg Phe Ala Asp Arg 1255 1260 1265	4122

ATA GGC TTT CTC ATA GAC AGA AAA TCC ACC AAA CTC TCC GAG AAC CTG Ile Gly Phe Leu Ile Asp Arg Lys Ser Thr Lys Leu Ser Glu Asn Leu 1270 1275 1280	4170
GGG GGA CAT ACA AAC AAG AAG AGG GCT TAC AAA TAT GAT TTT GAC TTG Gly Gly His Thr Asn Lys Lys Arg Ala Tyr Lys Tyr Asp Phe Asp Leu 1285 1290 1295	4218
GTA TAC CCC AGA AAA ATC GAA GAG ATA ACC TAC GAC GGC TAC GTC TAT Val Tyr Pro Arg Lys Ile Glu Glu Ile Thr Tyr Asp Gly Tyr Val Tyr 1300 1305 1310 1315	4266
GAC ATC GAG GTT GAG GGA ACC CAC AGG TTC TTC GCC AAC GGA ATA CTC Asp Ile Glu Val Glu Gly Thr His Arg Phe Phe Ala Asn Gly Ile Leu 1320 1325 1330	4314
GTT CAC AAC <u>ACA</u> GAC GGC TTT TTC GCA ACA ATC CCC GGA GCG GAC GCC Val His Asn Thr Asp Gly Phe Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala 1335 1340 1345	4362
GAG ACG GTC AAA AAG AAG GCC AGG GAG TTC CTT AAC TAC ATT AAC CCC Glu Thr Val Lys Lys Ala Arg Glu Phe Leu Asn Tyr Ile Asn Pro 1350 1355 1360	4410
AAG CTG CCC GGT CTC CTC GAA CTC GAG TAC GAG GGC TTC TAC AGG CGC Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Arg Arg 1365 1370 1375	4458
GGT TTC TTC GTA ACC AAG AAG TAC GCG GTG ATA GAC GAG GAG GGC Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly 1380 1385 1390 1395	4506
AAG ATA ACG ACG CGC GGG CTT GAG ATC GTC CGG CGC GAC TGG AGT GAG Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu 1400 1405 1410	4554
G TG GCT AAG GAG ACG CAG GCG AGG GTC TTG GAG GCC ATA CTG CGG CAC Val Ala Lys Glu Thr Gln Ala Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Arg His 1415 1420 1425	4602
GGT GAC GTC GAG GAG GCC GTG AGG ATT GTC AAG GAA GTG ACG GAA AAG Gly Asp Val Glu Glu Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys 1430 1435 1440	4650
CTG AGC AAG TAC GAG GTT CCG CCA GAG AAG CTC GTC ATC CAC GAG CAG Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln 1445 1450 1455	4698
ATT ACC AGG GAG CTG AAG GAC TAC AAG GCC ACC GGC CCG CAC GTG GCC Ile Thr Arg Glu Leu Lys Asp Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala 1460 1465 1470 1475	4746
ATA GCG AAG CGC CTC GCC GCG AGG GGG ATT AAG GTT CGC CCT GGG ACA Ile Ala Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Ile Lys Val Arg Pro Gly Thr 1480 1485 1490	4794
GTC ATC AGC TAC ATC GTC CTG AAA GGT TCC GGC AGG ATA GGG GAC AGG Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg 1495 1500 1505	4842

ACG ATA CCC TTC GAC GAG TTC GAC CCC ACG AAG CAC AGG TAC GAT GCG	4890
Thr Ile Pro Phe Asp Glu Phe Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala	
1510 1515 1520	
GAG TAC TAC ATC GAG AAC CAG GTT CTG CCG GCG GTG GAG AGA ATC CTC	4938
Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu	
1525 1530 1535	
AAG GCC TTC GGC TAC AAG AAG GAG GAT TTG CGC TAC CAG AAG ACG CGG	4986
Lys Ala Phe Gly Tyr Lys Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg	
1540 1545 1550 1555	
CAG GTT GGG CTG GGG GCG TGG CTC AAA ATG GGG AAG AAA <u>TGA</u>	5028
Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp Leu Lys Met Gly Lys Lys	
1560 1565 1568	
AGGCCAAGCT T	5039

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:2 :

- (i) CARACTRERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 774 acides aminés
- (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
- (ix) CARACTERISTIQUES
 - (A) NOM/CLE: ADN polymérase de *THERMOCOCCUS fumicola*ns *Tfu*
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCES: SEQ ID NO:2 :

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Arg Pro Val Ile	
1 5 10 15	
Arg Val Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg	
20 25 30	
Asp Phe Glu Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile	
35 40 45	
Glu Asp Val Lys Lys Ile Thr Ala Ser Arg His Gly Thr Thr Val Arg	
50 55 60	
Val Val Arg Ala Gly Lys Val Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Ile	
65 70 75 80	
Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile	
85 90 95	
Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Val Asp Ile Tyr Glu Tyr	
100 105 110	
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro	
115 120 125	
Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr	
130 135 140	
Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile	
145 150 155 160	
Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Lys Ile	
165 170 175	

Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Lys Glu Met Ile Lys
 180 185 190

Arg Phe Leu Lys Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
 195 200 205

Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Ser Glu
 210 215 220

Lys Leu Gly Val Lys Phe Ile Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255

His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg His Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270

Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Ile Phe Gly Gln Pro Lys Glu
 275 280 285

Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Ala Gln Ala Trp Glu Thr Gly Glu Gly
 290 295 300

Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320

Glu Leu Gly Arg Glu Phe Phe Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335

Val Gly Gln Ser Phe Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350

Val Glu Trp Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365

Pro Asn Lys Pro Ser Gly Arg Glu Leu Glu Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
 370 375 380

Ala Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
 385 390 395 400

Ala Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Ser His
 405 405 410

Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Gly Glu Tyr Asp
 415 420 425

Glu Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
 430 435 440

Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Asp Glu Arg Gln Lys Val Lys
 445 450 455

Lys His Met Lys Ala Thr Val Asp Pro Ile Glu Lys Lys Leu Leu Asp
 460 465 470 475

Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Phe Tyr Gly Tyr
 480 485 490

Tyr Gly Tyr Ala Lys Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
495 500 505

Val Thr Ala Trp Gly Arg Gln Tyr Ile Glu Thr Thr Met Arg Glu Ile
510 515 520

Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr Asp Gly Phe
525 530 535

Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
540 545 555 560

Arg Glu Phe Leu Asn Tyr Ile Asn Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Arg Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Val Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Ile Leu Arg His Gly Asp Val Glu Glu Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Glu Leu Lys Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Ile Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Ile Lys Val Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Thr Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Arg Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Lys Ala Phe Gly Tyr Lys Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Gly Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Met Gly Lys Lys
770 774

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:3 :

(i) CARACTRISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 360 acides aminés

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(ix) CARACTERISTIQUES

(A) NOM/CLE: intéine I-Tfu-1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCES: SEQ ID NO:3 :

Cys	His	Pro	Ala	Asp	Thr	Lys	Val	Ile	Val	Lys	Gly	Lys	Gly	Val	Val
1															
														10	15

Asn	Ile	Ser	Glu	Val	Arg	Glu	Gly	Asp	Tyr	Val	Leu	Gly	Ile	Asp	Gly	
														20	25	30

Trp	Gln	Lys	Val	Gln	Arg	Val	Trp	Glu	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Gly	Glu	Leu	
														35	40	45

Val	Asn	Ile	Asn	Gly	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Asn	His	Lys	Leu	Pro	Val	
														50	55	60

Val	Arg	Arg	Thr	Glu	Arg	Gln	Thr	Ala	Ile	Arg	Asp	Ser	Leu	Ala	Lys		
														65	70	75	80

Ser	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Val	Lys	Gly	Lys	Leu	Ile	Thr	Thr	Pro	Leu	
														85	90	95

Phe	Glu	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Glu	Arg	Glu	Asp	Val	Pro	Glu	Glu	Glu	
														100	105	110

Ile	Leu	Lys	Gly	Glu	Leu	Ala	Gly	Ile	Ile	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Leu	
														115	120	125

Leu	Arg	Lys	Asp	Val	Glu	Tyr	Phe	Asp	Ser	Ser	Arg	Gly	Lys	Lys	Arg	
														130	135	140

Val	Ser	His	Gln	Tyr	Arg	Val	Glu	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Gln	Glu	Glu		
														145	150	155	160

Asp	Phe	X	Arg	Arg	Ile	Val	Tyr	Ile	Phe	Glu	Arg	Leu	Phe	Gly	Val	
														165	170	175

Thr	Pro	Ser	Val	Tyr	Arg	Lys	Lys	Asn	Thr	Asn	Ala	Ile	Thr	Phe	Lys	
														180	185	190

Val	Ala	Lys	Lys	Glu	Val	Tyr	Leu	Arg	Val	Arg	Glu	Ile	Met	Asp	Gly	
														195	200	205

Ile	Glu	Asn	Leu	His	Ala	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Phe	Phe	Glu	Gly	
														210	215	220

Asp	Gly	Ser	Val	Asn	Lys	Val	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Val	Asn	Gln	Gly		
														225	230	235	240

Thr	Asn	Asn	Glu	Trp	Lys	Ile	Glu	Val	Val	Ser	Lys	Leu	Leu	Asn	Lys	
														245	250	255

Leu	Gly	Ile	Pro	His	Arg	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Glu	Arg	Glu	
														260	265	270

Lys Thr Met Thr Thr His Ile Leu Glu Ile Ala Gly Arg Asp Gly Leu
 275 280 285
 Ile Leu Phe Gln Thr Ile Val Gly Phe Ile Ser Thr Glu Lys Asn Met
 290 295 300
 Ala Leu Glu Glu Ala Ile Arg Asn Arg Glu Val Asn Arg Leu Glu Asn
 305 310 315 320
 Asn Ala Phe Tyr Thr Leu Ala Asp Phe Thr Ala Lys Thr Glu Tyr Tyr
 325 330 335
 Lys Gly Lys Val Tyr Asp Leu Thr Leu Glu Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe
 340 345 350
 Ala Asn Gly Ile Leu Thr His Asn
 355 360

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO:4 :

- (i) CARACTRISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 389 acides aminés
- (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine
- (ix) CARACTERISTIQUES
- (A) NOM/CLE: intéine I-Tfu-2
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCES: SEQ ID NO:4 :

Ser Val Thr Gly Asp Thr Glu Val Thr Ile Arg Arg Asn Gly Arg Ile
 1 5 10 15
 Glu Phe Val Pro Ile Glu Lys Leu Phe Glu Arg Val Asp His Arg Val
 20 25 30
 Gly Glu Lys Glu Tyr Cys Val Leu Gly Gly Val Glu Ala Leu Thr Leu
 35 40 45
 Asp Asn Arg Gly Arg Leu Val Trp Lys Lys Val Pro Tyr Val Met Arg
 50 55 60
 His Lys Thr Asp Lys Arg Ile Tyr Arg Val Trp Phe Thr Asn Ser Trp
 65 70 75 80
 Tyr Leu Asp Val Thr Glu Asp His Ser Leu Ile Gly Tyr Leu Asn Thr
 85 90 95
 Ser Lys Val Lys Pro Gly Lys Pro Leu Lys Glu Arg Leu Val Glu Val
 100 105 110
 Lys Pro Glu Glu Leu Gly Gly Lys Val Lys Ser Leu Ile Thr Pro Asn
 115 120 125
 Arg Pro Ile Ala Arg Thr Ile Lys Ala Asn Pro Ile Ala Val Lys Leu
 130 135 140
 Trp Glu Leu Ile Gly Leu Leu Val Gly Asp Gly Asn Trp Gly Gly Gln
 145 150 155 160
 Ser Asn Trp Ala Lys Tyr Tyr Val Gly Leu Ser Cys Gly Leu Asp Lys
 165 170 175

Ala Glu Ile Glu Arg Lys Val Leu Asn Pro Leu Arg Glu Ala Ser Val
180 185 190

Ile Ser Asn Tyr Tyr Asp Lys Ser Lys Lys Gly Asp Val Ser Ile Leu
195 200 205

Ser Lys Trp Leu Ala Gly Phe Met Val Lys Tyr Phe Lys Asp Glu Asn
210 215 220

Gly Asn Lys Ala Ile Pro Ser Phe Met Phe Asn Leu Pro Arg Glu Tyr
225 230 235 240

Ile Glu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Phe Ser Ala Asp Gly Thr Val Ser
245 250 255

Leu Arg Arg Gly Ile Pro Glu Ile Arg Leu Thr Ser Val Asn Arg Glu
260 265 270

Leu Ser Asp Ala Val Arg Lys Leu Leu Trp Leu Val Gly Val Ser Asn
275 280 285

Ser Leu Phe Thr Glu Thr Lys Pro Asn Arg Tyr Leu Glu Lys Glu Ser
290 295 300

Gly Thr His Ser Ile His Val Arg Ile Lys Asn Lys His Arg Phe Ala
305 310 315 320

Asp Arg Ile Gly Phe Leu Ile Asp Arg Lys Ser Thr Lys Leu Ser Glu
325 330 335

Asn Leu Gly Gly His Thr Asn Lys Lys Arg Ala Tyr Lys Tyr Asp Phe
340 345 350

Asp Leu Val Tyr Pro Arg Lys Ile Glu Glu Ile Thr Tyr Asp Gly Tyr
355 360 365

Val Tyr Asp Ile Glu Val Glu Gly Thr His Arg Phe Phe Ala Asn Gly
370 375 380

Ile Leu Val His Asn
385 389

REVENDICATIONS

- 1) ADN polymérase purifiée thermostable d'archabactéries de l'espèce *Thermococcus fumicolans* 5 ayant un poids moléculaire de l'ordre de 89 000 daltons et ses dérivés enzymatiquement équivalents.
- 2) ADN polymérase selon la revendication 1 dont 10 la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou un fragment de celle-ci ou encore un assemblage de tels fragments.
- 3) ADN polymérase selon la revendication 2 dont 15 la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2.
- 4) Une séquence d'ADN constituée par ou 20 comprenant la séquence codant pour une ADN polymérase selon quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Une séquence d'ADN selon la revendication 4 constituée par ou comprenant la séquence comprise entre 25 les nucléotides 357 à 5028 de la séquence SED ID NO: 1, ou un fragment de celle-ci ou encore un assemblage de tels fragments.
- 6) Une séquence d'ADN selon l'une des 30 revendications 4 à 5 constituée par ou comprenant les nucléotides 357 à 1674 et 2755 à 3156 et 4324 à 5028 de la séquence d'ADN représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SED ID NO: 1.
- 7) Un vecteur contenant la séquence d'ADN de 35 l'une quelconque des revendications 4 à 6.

8) Un hôte transformé par un vecteur selon la revendication 7.

9) Procédé de préparation d'une ADN polymérase thermostable d'archaebactéries de l'espèce *Thermococcus fumicola*ns, caractérisé en ce que l'on cultive l'hôte selon la revendication 8 dans des conditions permettant l'expression de ladite ADN polymérase et en ce que l'on extrait et récupère celle-ci par tout moyen approprié.

10

10) Procédé d'amplification enzymatique d'une séquence d'acide nucléique caractérisé en ce que l'on met en oeuvre une ADN polymérase thermostable selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

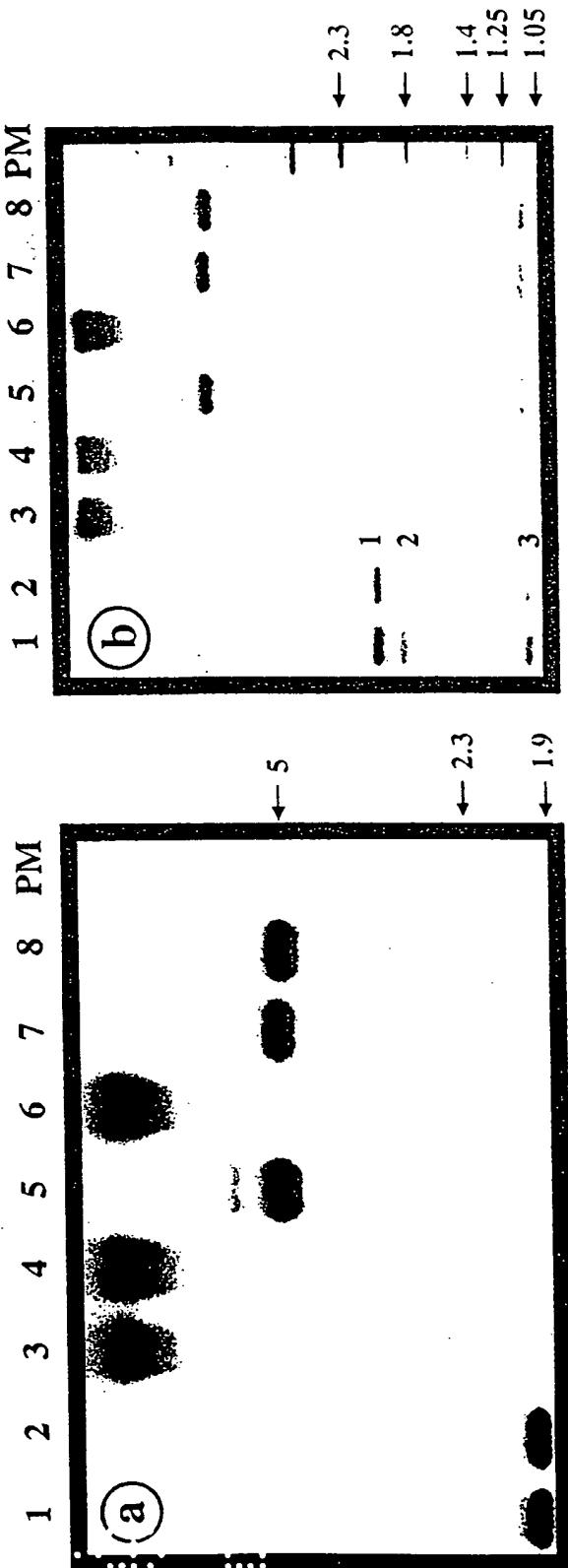
15

11) Intéine purifiée thermostable d'archaebacteries de l'espèce *Thermococcus fumicola*ns.

20

1/7

Fig.1



1: bande hybridée avec sonde GE23 Xhol-Sall
 2: bande hybridée avec sonde GE23 ClaI-HindIII
 3: bande hybridée avec sonde PCR

Enzymes de restriction: utilisées:

1: HindIII-HindIII; 2: HindIII-XbaI; 3: PstI-PstI; 4: PstI-XbaI; 5: PstI-Xhol; 6: XbaI-XbaI; 7: XbaI-Xhol; 8: Xhol-Xhol;
 PM= marqueur de poids moléculaire

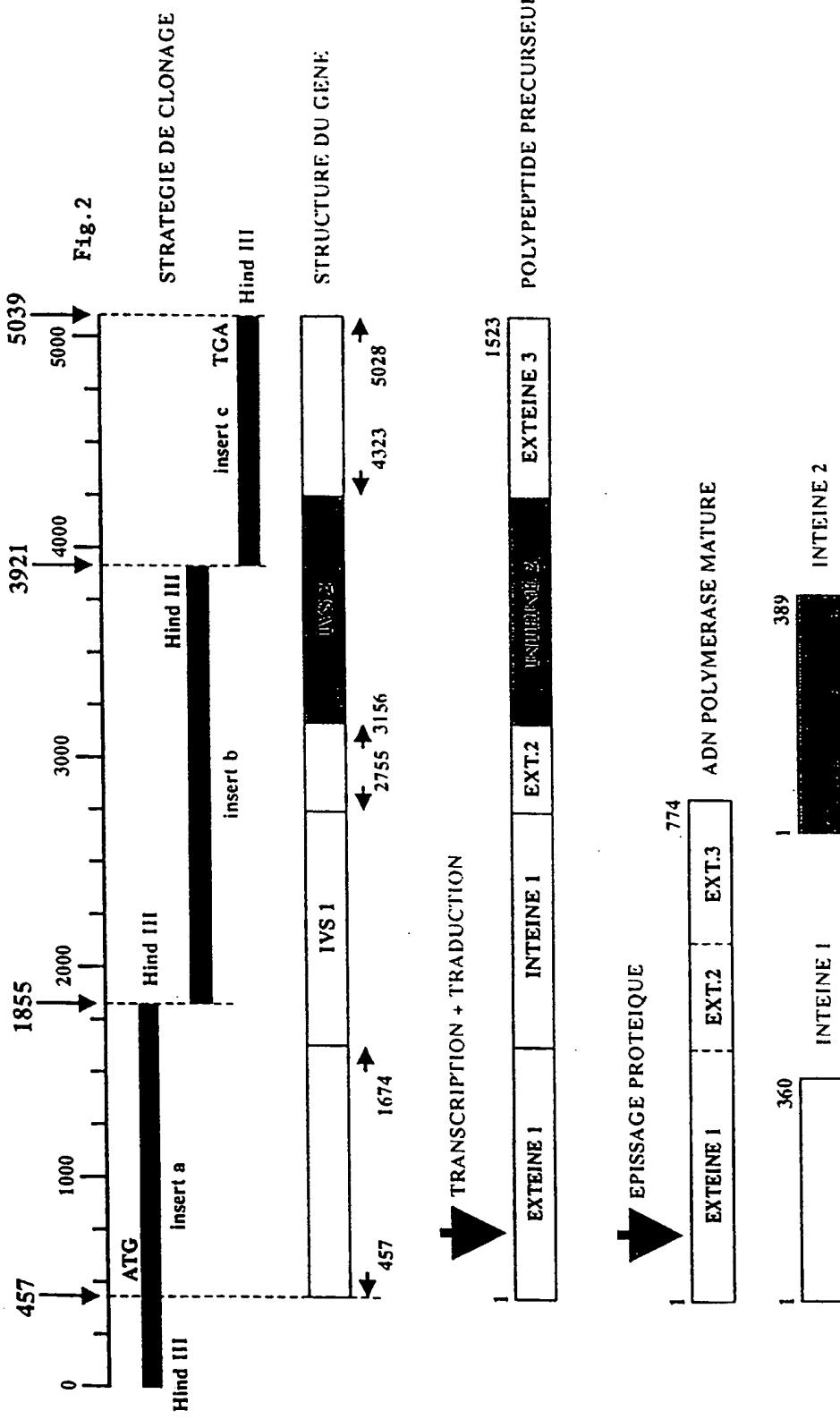
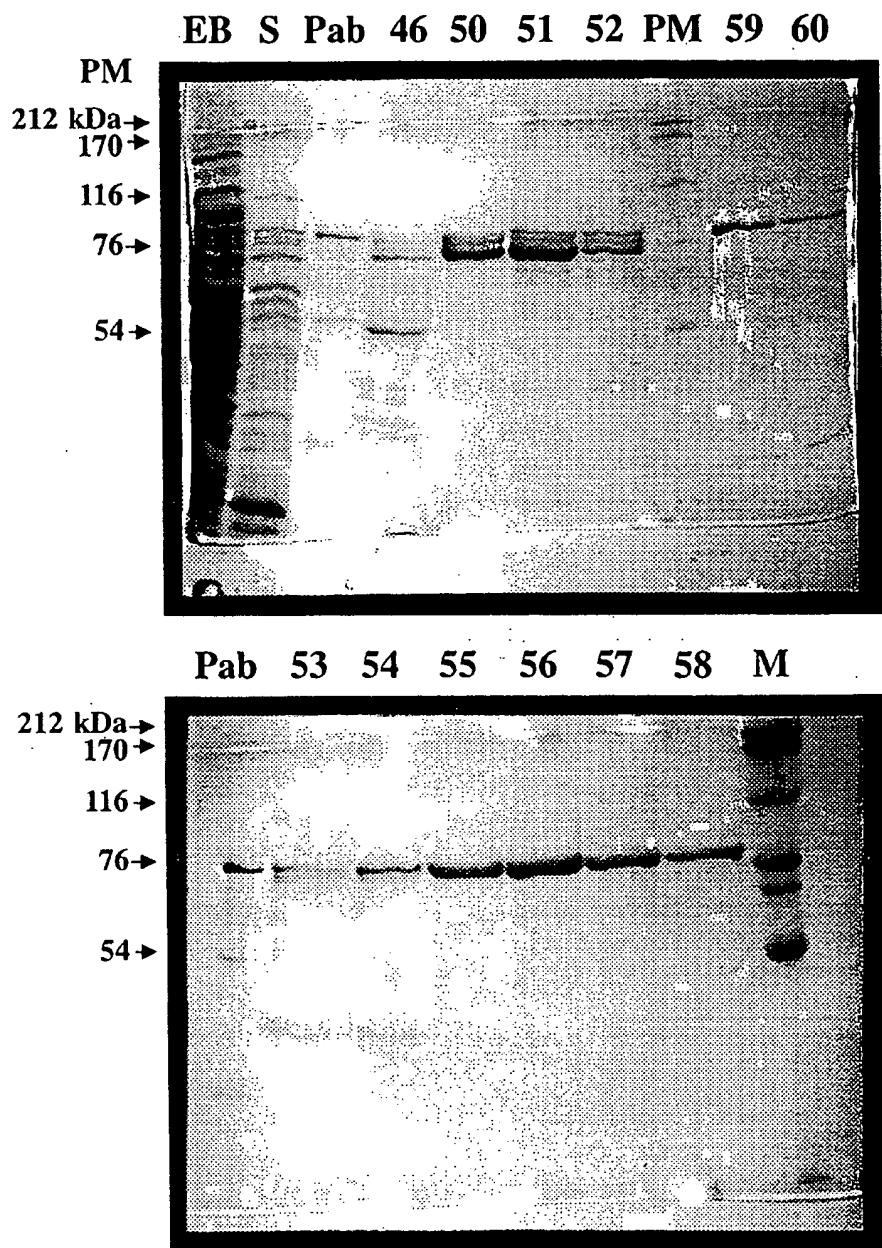


Fig.3



EB = extrait brut de sonication

S = surnageant chauffé

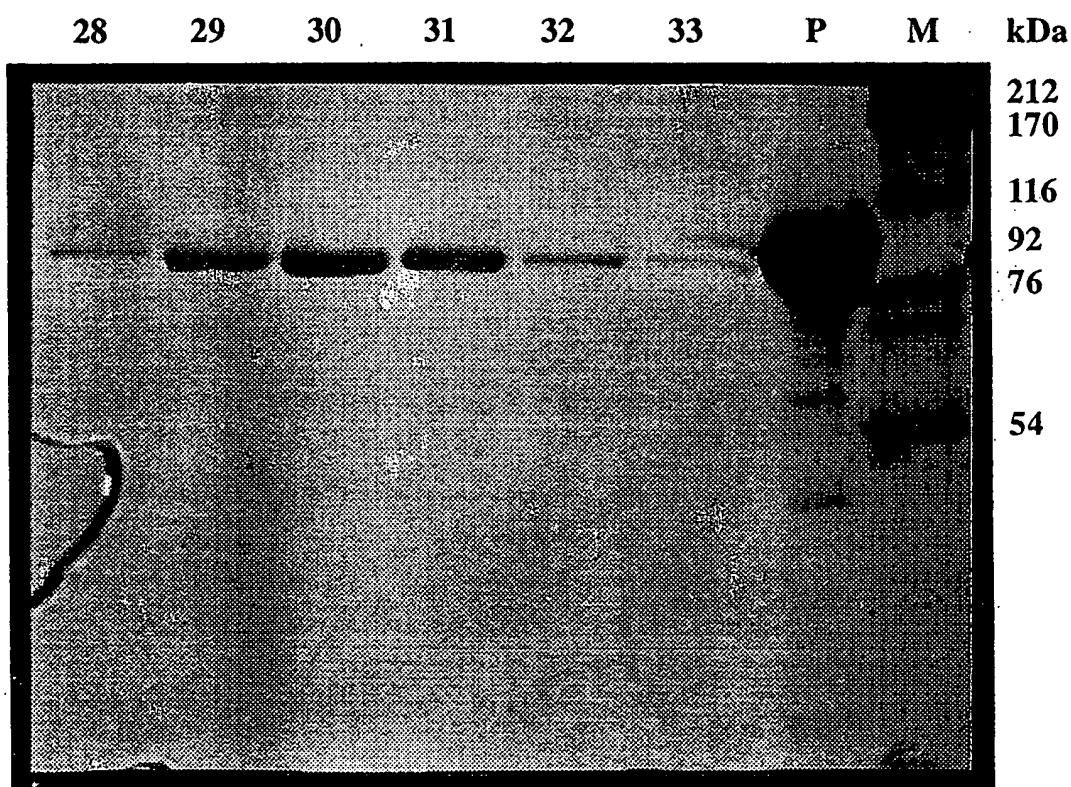
Pab \geq 50U de Pab

PM = poids moléculaire en kDa

FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

4/7

Fig.4



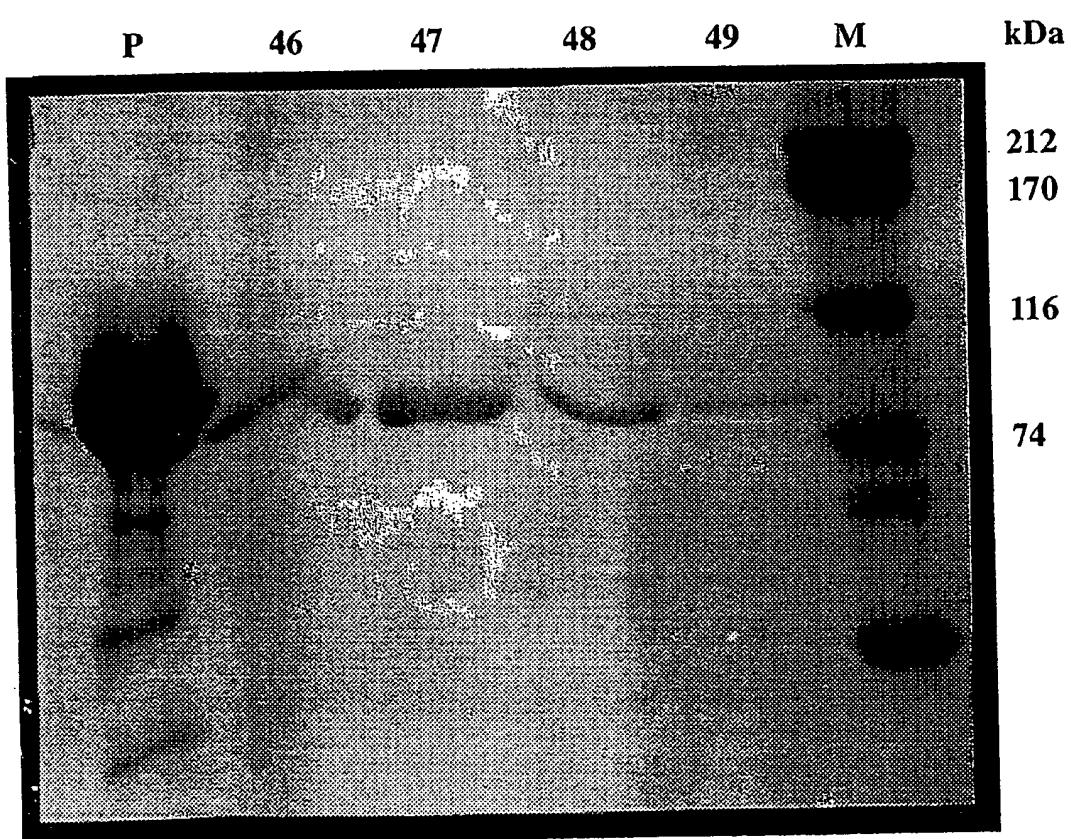
28, 29, 30, 31, 32, 33: fractions après la deuxième Bleue

P: phosphorylase B (92 kDa)

M: marqueur de poids moléculaire

5/7

Fig.5

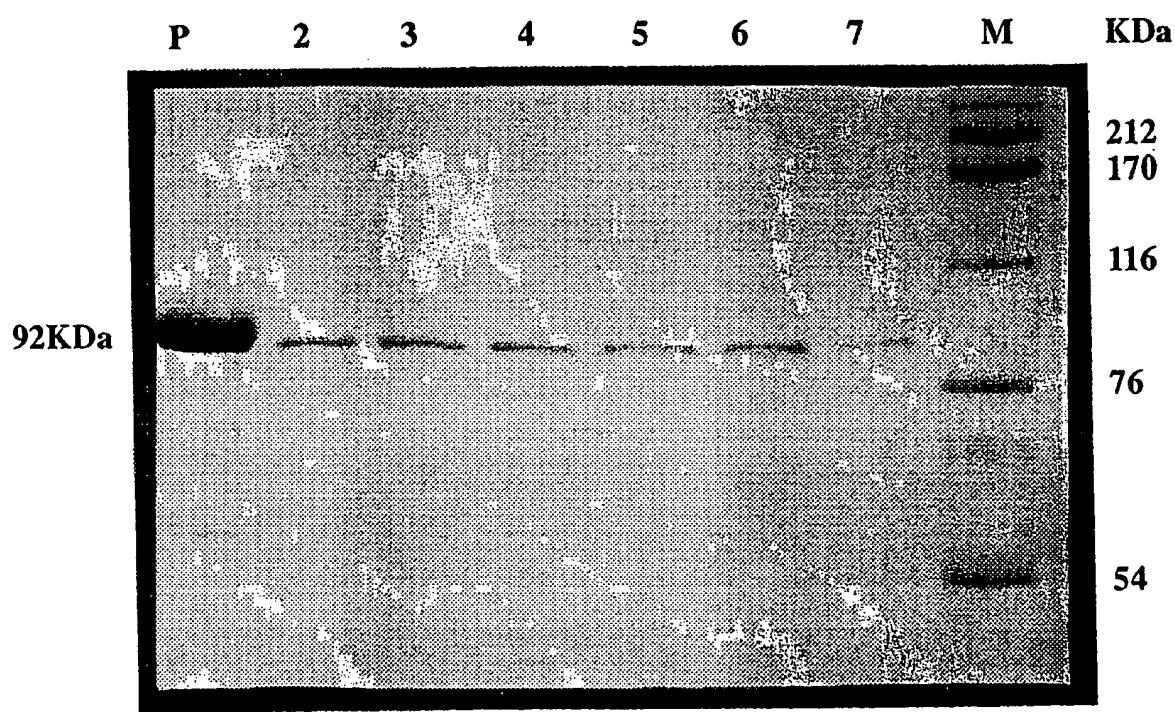


P: phosphorylase B (92 kDa)

46, 47, 48, 49: fractions après phosphocellulose

M: marqueur de poids moléculaire

Fig. 6



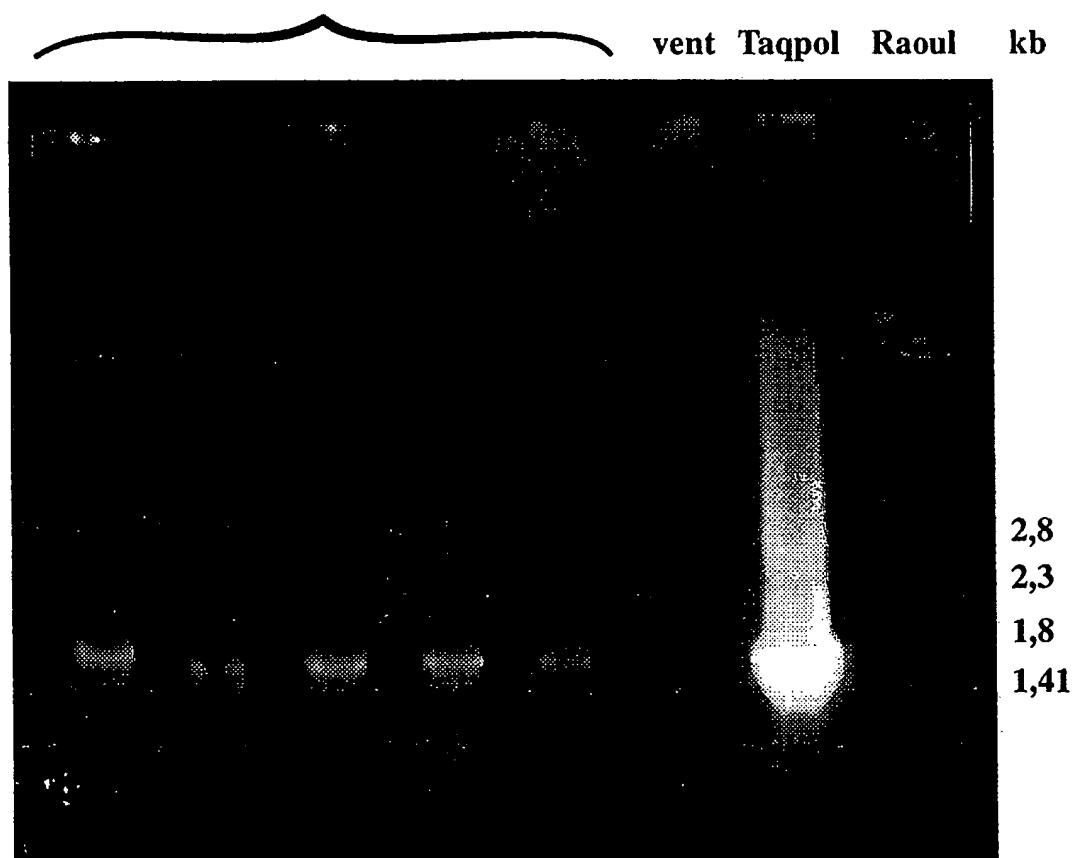
P: phosphorylase B (92 kDa)

2, 3, 4, 5, 6, 7: fractions d'exclusions sur MonoQ

M: marqueur de poids moléculaire

Fig.7

fractions d'exclusion de la MonoQ



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/00761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N9/12 //C12N15/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PIETROKOVSKI S: "A new intein in cyanobacteria and its significance for the spread of inteins" TRENDS IN GENETICS, vol. 12, no. 8, August 1996, page 287-288 XP004037128 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

9 December 1997

Date of mailing of the international search report

09.01.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/00761

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GODFROY A. ET AL.: "Thermococcus fumicolans sp. nov.: a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the north Fiji basin" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 46, no. 4, October 1996, WASHINGTON US, pages 1113-1119, XP002049496 cited in the application see the whole document ---	1-10
Y	EP 0 701 000 A (NEW ENGLAND BIOLABS INC) 13 March 1996 see page 11, line 20 - page 13, line 54 ---	1-10
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 007, 31 July 1996 & JP 08 070864 A (TOYOB0 CO LTD), 19 March 1996, see abstract ---	11
Y	HODGES R. A. ET AL: "PROTEIN SPLICING REMOVES INTERVENING SEQUENCES IN AN ARCHAEA DNA POLYMERASE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 23, 1992, pages 6153-6157, XP002033279 cited in the application see the whole document ---	11
A	PERLER F. B. ET AL: "INTERVENING SEQUENCES IN AN ARCHAEA DNA POLYMERASE GENE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, June 1992, pages 5577-5581, XP002033280 ---	11
A	EP 0 602 899 A (NEW ENGLAND BIOLABS INC) 22 June 1994 see abstract see page 4, line 40 - page 5, line 44 -----	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00761

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0701000 A	13-03-96	JP 8168376 A	02-07-96
EP 0602899 A	22-06-94	JP 7070200 A CA 2110938 A	14-03-95 10-06-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. ...nde Internationale No
PCT/FR 97/00761

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N9/12 //C12N15/54

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PIETROKOVSKI S: "A new intein in cyanobacteria and its significance for the spread of inteins" TRENDS IN GENETICS, vol. 12, no. 8, août 1996, page 287-288 XP004037128 voir le document en entier --- -/-	11

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

2

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
9 décembre 1997	09.01.98
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 97/00761

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GODFROY A. ET AL.: "Thermococcus fumicola sp. nov.: a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the north Fiji basin" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 46, no. 4, octobre 1996, WASHINGTON US, pages 1113-1119, XP002049496 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-10
Y	EP 0 701 000 A (NEW ENGLAND BIOLABS INC) 13 mars 1996 voir page 11, ligne 20 - page 13, ligne 54 ---	1-10
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 007, 31 juillet 1996 & JP 08 070864 A (TOYOB CO LTD), 19 mars 1996, voir abrégé ---	11
Y	HODGES R. A. ET AL: "PROTEIN SPLICING REMOVES INTERVENING SEQUENCES IN AN ARCHAEA DNA POLYMERASE" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 23, 1992, pages 6153-6157, XP002033279 cité dans la demande voir le document en entier ---	11
A	PERLER F. B. ET AL: "INTERVENING SEQUENCES IN AN ARCHAEA DNA POLYMERASE GENE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, juin 1992, pages 5577-5581, XP002033280 ---	11
A	EP 0 602 899 A (NEW ENGLAND BIOLABS INC) 22 juin 1994 voir abrégé voir page 4, ligne 40 - page 5, ligne 44 -----	11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 97/00761

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0701000 A	13-03-96	JP 8168376 A	02-07-96
EP 0602899 A	22-06-94	JP 7070200 A CA 2110938 A	14-03-95 10-06-94

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.